

CÁTIA ANDREIA PEREIRA MARTINS

# Quantificação de DNA por PCR em Tempo Real em diferentes Amostras Forenses

**Orientadora:** Prof. Doutora LAURA SOFIA RAMOS MENDES CAINÉ  
(Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. e Departamento de Medicina Legal e Ciências Forenses da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

**Co-Orientadora:** Mestre GABRIELA MARIA MOURA DE VASCONCELOS LIMA (Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.)

**Co-Orientadora:** Mestre MARIA RAQUEL DINIZ LEITÃO CARVALHO  
(Laboratório da Polícia Científica – Polícia Judiciária)

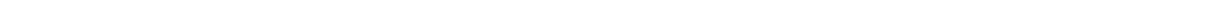
Dissertação de mestrado apresentada à Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Forenses.

Porto  
Setembro 2016

---

## ***Dedicatória***

Ao meu tio *Miguel Alves*.



## ***Agradecimentos***

---

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos, em particular:

À ***Professora Doutora Laura Cainé***, que se dispôs a orientar o meu trabalho e cujo apoio e dedicação foram cruciais para a realização do mesmo;

À ***Mestre Gabriela Lima*** agradeço toda a disponibilidade, orientação e apoio prestados nos momentos difíceis ao longo deste trabalho, sem os quais esta dissertação não teria sido possível existir;

À ***Mestre Raquel Carvalho*** agradeço também, a disponibilidade no apoio prestado para a realização deste trabalho;

A toda a ***equipa do Serviço de Genética e Biologia Forenses*** – Delegação do Norte, Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses do Porto, agradeço todo o carinho e amizade com que me receberam;

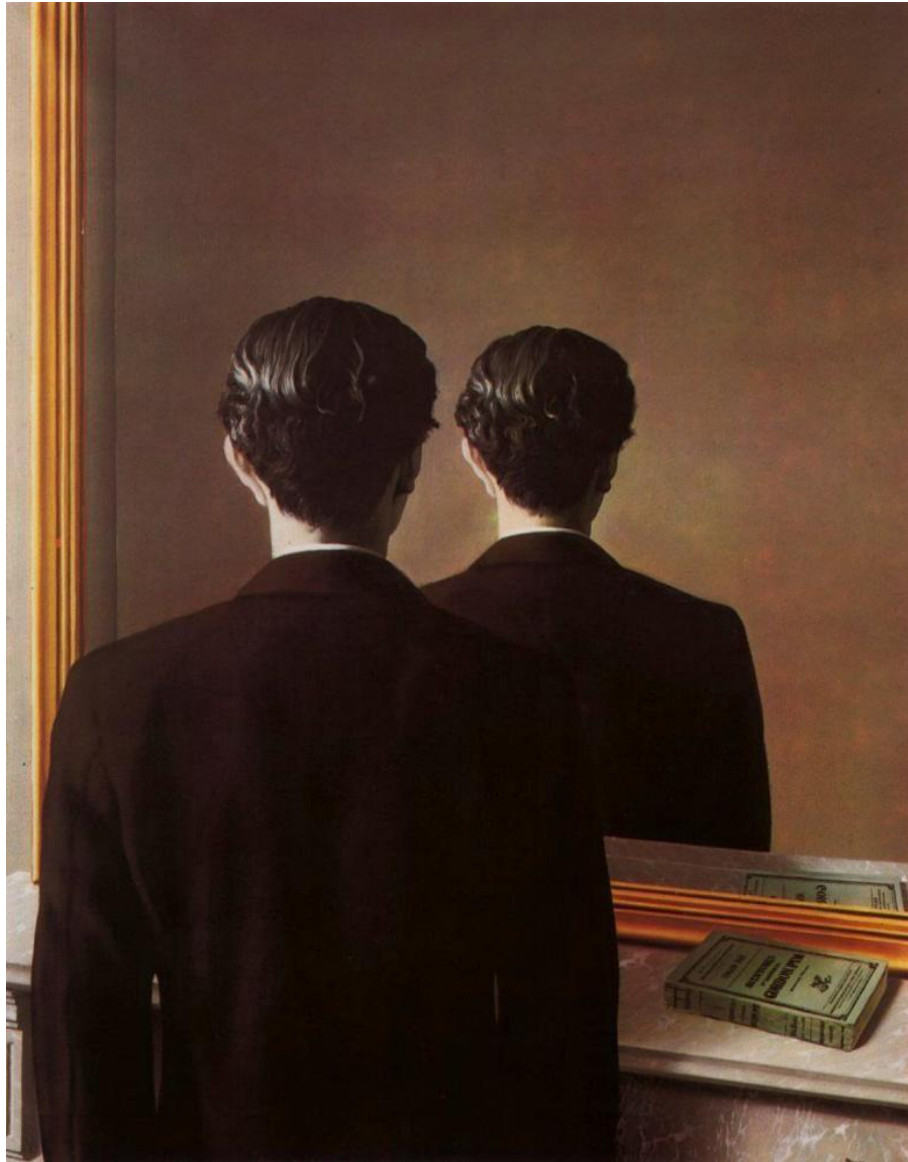
À minha ***mãe Nair*** e à minha ***irmã Rita***, por todo o incentivo, carinho, apoio, força e amor. É impossível descrever a minha gratidão por tudo aquilo que fizeram e fazem por mim;

Ao ***João***, por continuar ao meu lado, incentivando-me incessantemente, compartilhando as minhas angústias e hesitações. Mesmo longe, sempre presente nos momentos mais difíceis. Por tudo isto e muito mais, terá sempre a minha gratidão e o meu respeito;

À minha ***família e amigos***, pelo seu apoio incondicional e compreensão;

E por fim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

O meu muito obrigado!



**Rene Magritte**

“Do what you can, with what you have, where you are.”  
— Theodore Roosevelt

---

# RESUMO

---

A robustez e qualidade dos resultados provenientes das perícias realizadas em análises de DNA (Ácido desoxirribonucleico) revestem-se de suprema importância em Genética Forense. A estimativa *à priori* da quantidade de DNA existente em amostras é essencial, permitindo decidir a forma de procedimento mais eficiente sem perda de amostra.

O elevado número de cópias por célula e a grande resistência à degradação devida a factores ambientais, que permitem a sua utilização em estudos de material biológico degradado e/ou em quantidades reduzidas, fazem do DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta determinante nestas perícias. Contudo, a análise de DNA nuclear (ncDNA) permanece como a principal ferramenta da Genética Forense devido ao elevado poder de cada perfil genético assim obtido.

A quantificação de DNA assegura a competência dos ensaios realizados em amostras forenses. Obtendo uma estimativa precisa da quantidade de moléculas de DNA presentes numa amostra, previne-se o seu desperdício durante os ensaios. A sua execução por PCR em Tempo-Real (rt-PCR), que se destaca pela sua reprodutibilidade, precisão e sensibilidade, torna-a numa metodologia de eleição para a quantificação absoluta de amostras problema (amostras cuja a quantidade de DNA presente é desconhecida, que podem apresentar degradação e/ou que podem conter inibidores).

Neste estudo, a quantificação de DNA humano (nuclear – ncDNA - e mitocondrial - mtDNA) foi realizada não só a partir de três tipos de amostras biológicas distintas (sangue, zaragoas bucais e cabelo), mas também de diversas concentrações de DNA, obtidas a partir do controlo *DNA K562 (Promega)*. Utilizaram-se dois métodos de quantificação por PCR em Tempo-Real (um *kit* comercial, o “*Quantifiler® Trio Quantification Kit*” para quantificação de ncDNA e um ensaio, o “*TaqMan® Universal Master Mix*”, para a quantificação de mtDNA). Com base nos resultados foram testados diversos protocolos da amplificação por PCR para determinar o ensaio mais adequado.

O objetivo deste estudo foi obter uma metodologia protocolar passível de reprodutibilidade, que após a avaliação do impacto na rotina laboratorial, permite a redução de custos e tempo.

---

**Palavras- Chave:** Genética Forense, Quantificação de DNA, PCR em Tempo-Real.

# ABSTRACT

---

The strength and quality of the results from DNA (Deoxyribonucleic acid) analysis are of main importance in Forensic Genetics. The ability to obtain results in unknown DNA samples is essential, allowing to decide how to proceed most effectively without any loss of sample.

The high copy number per cell and high resistance to environmental factors, that allow its use in studies of degraded biological material and/or small quantities, make the mitochondrial DNA (mtDNA) a determining tool in forensic casework. However, analysis of the nuclear DNA (ncDNA) remains the leading forensic genetics tool due to the uniqueness of each genetic profile obtained.

The quantification of DNA ensures the competence of the assays in forensic samples. Obtaining a clear estimation of the quantity of DNA molecules present in a sample to prevents the wastage during the tests. Its implementation by PCR Real-Time (RT-PCR), which stands out for its reproducibility, precision and sensitivity, makes it an attractive test for absolute quantification of unknown samples.

In this study, the quantification of human DNA (nuclear – ncDNA - and mitochondrial - mtDNA) was performed from three different types of biological samples (blood, buccal swabs and hair) and various concentrations of DNA control *DNA K562* (Promega). It was used two methods of quantification by Real-time PCR (a commercial kit, "Quantifiler® Trio Quantification Kit" for quantifying the ncDNA and test the "TaqMan® Universal Master Mix" for quantifying mtDNA). Based on these results, several PCR protocols was tested to determine the most appropriate assay.

The aim of this study was to obtain a protocol methodology capable of reproducibility, fulfilling the requirements of a good practice in the laboratory routine, reducing costs and time.

---

**Keywords:** Forensic Genetics, DNA Quantification, Real-Time PCR.

# Índice

---

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Aplicação do estudo de DNA em Genética Forense.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 DNA nuclear em contexto forense.....	2
1.1.2 DNA mitocondrial em contexto forense .....	4
<b>1.2 PCR em tempo-real.....</b>	<b>6</b>
- Sondas TaqMan® .....	9
Análise de resultados .....	10
<b>1.3 Quantificação do DNA .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Kit's para análise de fragmentos de DNA .....</b>	<b>13</b>
Complicações associadas a análise de fragmentos.....	15
<b>II. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Colheita e descrição das amostras utilizadas .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Extração de DNA das amostras .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Sangue e células epiteliais bucais .....	19

3.2.2	Cabelos .....	20
<b>3.3</b>	<b>Quantificação de DNA pela PCR em tempo-real .....</b>	<b>20</b>
331	Ensaio <i>TaqMan® Universal Master Mix</i> (Applied Biosystems) .....	20
	A. Método de quantificação por ensaio <i>TaqMan® Universal Master Mix</i> para mtDNA .....	21
	B. Método de quantificação por ensaio <i>TaqMan® Universal Master Mix</i> para mtDNA e ncDNA .....	23
332	<i>Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit</i> (Applied Biosystems) .....	25
<b>3.4</b>	<b>Amplificação do ncDNA utilizando <i>kit's</i> comerciais .....</b>	<b>26</b>
341	<i>AmpFlSTR® NGM SElect™</i> (Applied Biosystems) .....	26
342	<i>PowerPlex® ESI 17 Pro System</i> (Promega) .....	26
343	<i>PowerPlex® Fusion System</i> (Promega) .....	26
344	<i>GlobalFiler™</i> (Applied Biosystems) .....	27
345	<i>AmpFlSTR® MiniFiler™</i> (Applied Biosystems) .....	27
<b>3.5</b>	<b>Análise de fragmentos STR .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise de mtDNA por sequenciação direta da região HVI e HVII .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Quantificação de DNA .....</b>	<b>30</b>
4.1.1	Quantificação através do procedimento de ensaio pela PCR em tempo- real usando “ <i>TaqMan® Universal PCR Master Mix</i> ” .....	30



A. Protocolo descrito por <i>Alonso et al.</i> , 2004.....	31
B. Protocolo descrito por <i>Niederstätter et al.</i> , 2007.....	31
- Precisão .....	32
- Sensibilidade .....	34
4.1.2 Quantificação através do kit “Quantifiler® Trio DNA Quantification” pela PCR em tempo-real .....	38
- Precisão.....	39
- Sensibilidade .....	41
<b>4.2 Impacto da quantificação no DNA humano</b>	
- Recurso às amostras biológicas .....	43
4.2.1 Quantificação de ncDNA .....	44
- Índice de degradação .....	47
4.2.2 Quantificação de mtDNA .....	47
<b>4.3 Aplicações da quantificação de DNA humano .....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Análise de fragmentos STR .....	51
4.3.2 Sequenciação de mtDNA .....	53
<b>V. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO I – Protocolos Laboratoriais.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO II – Informação Suplementar .....</b>	<b>80</b>
• Artigo científico .....	95

## ***Lista de Figuras***

---

### **II – INTRODUÇÃO**

<b>Figura 1.1</b> – Esquema representativo do DNA mitocondrial .....	5
<b>Figura 1.2</b> – Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR. Intensidade de fluorescência ( $\Delta R_n$ ) vs nº de ciclos da PCR.....	7
<b>Figura 1.3</b> – Representação da tecnologia <i>TaqMan</i> ® .....	10
<b>Figura 1.4</b> – Curva padrão obtida por sucessiva análise de amostras com concentrações de DNA conhecidas (de (a) a (e)) .....	12
<b>Figura 1.5</b> – Exemplo de um <i>allelic ladder</i> (A) e de um <i>internal size standard</i> (B).....	14

### **IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

<b>Figura 4.1</b> - Correlação dos valores médios de $C_T$ em função do log do nº de cópias presente nas diluições padrão e o erro que lhes está associado .....	33
<b>Figura 4.2</b> –Gráfico representativo da amplificação/quantificação de mtDNA por rt-PCR, relativa às diversas concentrações testadas do controlo <i>DNA K562</i> (30 ng/ $\mu$ L a 0,000625 ng/ $\mu$ L de $DNA_{Total}$ ).....	35
<b>Figura 4.3</b> – Gráfico com os valores da concentração de mtDNA em escala log e de $C_T$ , obtidos para as concentrações testadas através da rt-PCR e o erro padrão associado .....	36
<b>Figura 4.4</b> – Correlação da quantidade (nº de cópias de mtDNA) vs $C_T$ , no estudo da sensibilidade e comparação com resultados obtidos para o parâmetro da precisão .....	37

**Figura 4.5** – Valores médios de  $C_T$  e respetivo erro associado, para as diversas concentrações de DNA padrão testadas e alvos selecionados.....39

**Figura 4.6** - Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  em função da concentração de ncDNA em ambos os alvos (*large* e *small*) e respetivo erro associado..... 40

**Figura 4.7** - Correlação da quantidade de ncDNA esperada (em escala logarítmica) vs o  $C_T$ , para o estudo da sensibilidade.....42

## ANEXO II – Informação Suplementar

**Figura B1** – Gráfico relativo às diluições padrão, com os respectivos valores de  $C_T$  e médias correspondentes. Barra de erro representada para as médias de  $C_T$ ..... 81

**Figura B2** – Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  mas em função do logaritmo da concentração de mtDNA. A representação gráfica é relativa às 8 diluições padrão, realizadas em 5 ensaios e respetivo valor do coeficiente de correlação ..... 81

**Figura B3** – Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  em função da concentração de mtDNA. Representações gráficas relativas às 14 diluições realizadas, com o erro padrão associado e o valor do coeficiente de correlação..... 84

**Figura B4** – Imagem com os 4 gráficos, de acordo com o parâmetro em análise, representativos da amplificação e posterior quantificação de ncDNA por rt-PCR, relativo às diferentes concentrações testadas do controlo *DNA K562* (30 a 0,000625 ng/ $\mu$ L de DNA).....86

**Figura B5** – Correlação entre valores de  $C_T$  em função da concentração de DNA. Representações gráficas relativas às 14 diluições realizadas, com o erro padrão associado e o valor do coeficiente de correlação..... 88

## Lista de Tabelas

---

### I – INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1.1</b> – Vantagens referentes a utilização de STR como ferramenta de identificação genética individual.....	3
--	---

<b>Tabela 1.2</b> – Valores de $C_T$ vs Quantidade de DNA.....	8
--	---

<b>Tabela 1.3</b> – Tabela representativa de alguns <i>loci</i> utilizados nos <i>kit's</i> comerciais para a obtenção de perfis de DNA .....	13
---	----

### III – MATERIAL E MÉTODOS

<b>Tabela 3.1</b> –Diluições padrão “ <i>TaqMan®Universal Master Mix</i> ” utilizadas.....	21
--	----

<b>Tabela 3.2</b> – Sequência da sonda e <i>primers</i> descritos para o mtDNA, por <i>Alonso et al.</i> (2004) .....	21
---	----

<b>Tabela 3.3</b> – Alterações efetuadas no protocolo de quantificação de mtDNA.....	22
--	----

<b>Tabela 3.4</b> – Condições para a PCR convencional .....	22
---	----

<b>Tabela 3.5</b> - Sequência das sondas e <i>primers</i> descritos para o ncDNA e mtDN, por <i>Niderstätter et al.</i> (2007) .....	23
--	----

<b>Tabela 3.6</b> – Volumes da reação de quantificação em separado e em simultâneo de ncDNA e mtDNA .....	24
---	----

<b>Tabela 3.7</b> – Alterações efetuadas no protocolo para quantificação em simultâneo de ncDNA e mtDNA .....	25
---	----

<b>Tabela 3.8</b> – Diluições padrão “Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit” utilizadas.....	25
---	----

#### IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>Tabela 4.1</b> – Resumo das possíveis condições limitantes do protocolo testado, para a quantificação de ncDNA e mtDNA ( <i>Niederstätter 2007</i> ) .....	31
---	----

<b>Tabela 4.2</b> – Conversão da concentração de ncDNA na concentração de mtDNA e respetivo nº de cópias de mtDNA .....	32
---	----

<b>Tabela 4.3</b> – Valores obtidos nos diferentes parâmetros analisados, em cada diluição padrão de mtDNA .....	34
--	----

<b>Tabela 4.4</b> – Concentrações de DNA <sub>Total</sub> testadas para a sensibilidade e respetiva correspondência em mtDNA.....	35
---	----

<b>Tabela 4.5</b> – Valores das médias dos desvios padrão com o valor das médias de C <sub>T</sub> para cada diluição padrão de ncDNA .....	40
---	----

<b>Tabela 4.6</b> – Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (manchas de sangue) .....	45
---	----

<b>Tabela 4.7</b> – Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (zaragatoas bucais) .....	45
---	----

<b>Tabela 4.8</b> – Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (cabelo) .....	46
--	----

<b>Tabela 4.9</b> – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (mancha de sangue) .....	48
--	----

<b>Tabela 4.10</b> – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (zaragatoas bucais) .....	48
--	----

<b>Tabela 4.11</b> – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/ $\mu$ L) presentes em cada amostra testada (cabelo) .....	49
<b>Tabela 4.12</b> - Valores relativos aos coeficientes de correlação ( $R^2$ ), obtidos para os 8 ensaios distintos, na quantificação de mtDNA, em 3 tipos de amostras diferentes .....	49
<b>Tabela 4.13</b> - Kit's comerciais testados na amplificação de DNA .....	51
<b>Tabela 4.14</b> - Perfis genéticos obtidos para as amostras em análise e controlo <i>DNA K562</i> (3 kit's comerciais distintos).....	52
<b>Tabela 4.15</b> – Amostras seleccionadas para análise de fragmentos e onde foi possível visualizar um perfil completo.....	53

## **ANEXO II – Informação Suplementar**

<b>Tabela B1</b> – Tabela de valores de $C_T$ , em função da concentração de mtDNA padrão, em duplicado, obtidos nos 5 ensaios .....	80
<b>Tabela B2</b> – Tabela com a conversão dos valores da concentração de $DNA_{Total}$ e mtDNA, assim como o respetivo número de Cópia de mtDNA correspondente. Informação extra relativa aos valores, mas em função logarítmica .....	82
<b>Tabela B3</b> – Tabela com os valores da quantificação para mtDNA, obtidos através da rt-PCR, nas 14 concentrações testadas, assim como os respetivos valores de $C_T$ .....	83
<b>Tabela B4</b> – Tabela com informação relativa ao valor esperado e obtido para a concentração de mtDNA, nas diluições testadas. São também apresentados o respetivo desvio padrão e coeficiente de variação, para cada amostra .....	83
<b>Tabela B5</b> – Tabela complementar dos valores de $C_T$ , em função da concentração do ncDNA padrão, em duplicado, obtidos nos respetivos 3 ensaios e para os diferentes alvos .....	85

**Tabela B6** – Tabela completa, relativa ao valor obtido para a concentração de ncDNA nas diluições testadas e o respetivo  $C_T$  obtido para cada quantificação. A quantificação apresenta-se discriminada, de acordo com os alvos presentes no *kit* utilizado..... 87

**Tabela B7** – Tabela completa, relativa ao valor obtido para a concentração de ncDNA nas amostras estudadas e o respetivo  $C_T$  obtido para cada quantificação. A quantificação apresenta-se discriminada, de acordo com os alvos presentes no *kit* utilizado ..... 89

## *Lista de Abreviaturas*

---

<b>%</b> – Percentagem	<b>pb</b> – Pares de bases
<b>µg</b> – Micrograma	<b>pg</b> – Picograma
<b>µL</b> – Microlitro	<b>pg/µL</b> – Picograma/microlitro
<b>°C</b> – Graus celsius	<b>qPCR</b> – Quantificação pela PCR
<b>CB</b> – Amostra de cabelo	<b>R<sup>2</sup></b> - Coeficiente de correlação
<b>CODIS</b> – <i>Combined DNA Index System</i>	<b>rCRS</b> – <i>Revised Cambridge Reference Sequence</i>
<b>CRS</b> – <i>Cambridge Reference Sequence</i>	<b>RFLP</b> – <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
<b>C<sub>T</sub></b> – <i>Cycle Threshold</i>	<b>RFU</b> – Unidade de fluorescência
<b>CV</b> – Coeficiente de variação	<b>Rn</b> – Sinal de fluorescência
<b>DNA</b> – Ácido desoxirribonucleico	<b>rpm</b> – Rotações por minuto
<b>dNTP's</b> – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados	<b>rt - PCR</b> – PCR em tempo real
<b>E</b> – Eficiência	<b>seg</b> - Segundo
<b>FBI</b> – <i>Federal Bureau of Investigation</i>	<b>SG</b> – Amostra de Sangue
<b>h</b> - Hora	<b>SNP</b> – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>HiDi</b> – Formamida desionizada	<b>STD</b> – <i>Standard</i>
<b>HVR</b> – Regiões hipervariáveis (I a III)	<b>STR</b> – <i>Short Tandem Repeat</i>
<b>ID</b> – Índice de degradação	<b>TBE</b> – Tris borato - EDTA
<b>IPC</b> – <i>Internal PCR Control</i>	<b>up</b> – Ultra pura
<b>ISS</b> – <i>Internal Size Standard</i>	<b>U.V.</b> – Ultravioleta
<b>min</b> – Minutos	<b>V</b> – Volts
<b>mini-STR</b> – <i>mini Short Tandem Repeat</i>	<b>VNTR</b> – <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
<b>mL</b> - Mililitro	<b>ZG</b> – Amostra de zaragatoa bucal
<b>M.S.</b> – Mancha de sangue	
<b>mtDNA</b> – DNA mitocondrial	
<b>ncDNA</b> – DNA nuclear	
<b>ng</b> – Nanograma	
<b>ng/µL</b> – Nanograma/microlitro	
<b>nM</b> – Nanomole	
<b>NTC</b> – Controlo negativo	
<b>PCR</b> – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	



## I - INTRODUÇÃO

---

# I – INTRODUÇÃO

## 1.1 Aplicação do estudo de DNA em Genética Forense

A identificação humana é definida por um conjunto de caracteres individualizantes através dos quais se determina a identidade de um indivíduo [1].

Na identificação genética é determinado o perfil genético individual em amostras biológicas (p.ex. manchas de sangue, sémen, pelos e zaragatoas bucais). Assim, estudam-se marcadores genéticos, para identificação no âmbito de:

- (1) Processos de Investigação Biológica de Parentesco,
- (2) Processos de Identificação Genética Individual e
- (3) Processos Criminais [2, 3, 4].

Os perfis obtidos são posteriormente comparados com amostras de referência<sup>1</sup> de sangue e/ou saliva de vítima(s) e/ou suspeito(s) e/ou referentes à Base de Dados de DNA (ácido desoxirribonucleico) [5].

Aproximadamente 99,7 % da sequência de DNA humano é idêntica entre os indivíduos, variando apenas uma pequena fração que apresenta grande relevância para a diferenciação e individualidade humana. É através destas regiões do genoma, altamente polimórficas, que se torna possível a identificação humana [6].

### 1.1.1 DNA nuclear em contexto forense

O genoma nuclear está organizado em cromossomas de forma compactada e protegido por proteínas designadas histonas. O ncDNA (DNA nuclear) contém regiões repetitivas designadas por DNA satélite que são definidas de acordo com o seu tamanho e número de vezes que se iteram as unidades de repetição. Estes marcadores genéticos (polimorfismos de DNA) variam entre os VNTR (*“Variable Number of Tandem Repeats”*, atualmente em desuso),

---

<sup>1</sup>Amostras de origem conhecida e que servem de referência a um determinado indivíduo, para determinação do seu perfil genético.

e os STR (“*Short Tandem Repeats*”), que são os marcadores com maior aplicação no âmbito forense [6, 7, 8].

Os STR, encontrando-se em abundância no genoma humano, correspondem a aproximadamente 3% do mesmo. A **Tabela 1.1**, baseada no descrito por *Pinheiro* (2008), apresenta as vantagens dos STR relativamente à sua utilização.

**Tabela 1.1** – Vantagens referentes a utilização de STR como ferramenta de identificação genética individual.

Características dos STR
1. Conter alelos com tamanhos similares
2. Menor amplificação preferencial para alelos de pequeno tamanho
3. Obtenção de produtos de PCR de tamanho reduzido
4. Fácil análise através de técnicas da PCR, com redução de efeitos estocásticos

A partir de fragmentos STR foi criada, pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI), a primeira base de dados de perfis genéticos mundial, tendo ficado operacional em 1998. Esta base de dados denominada CODIS (“*Combined DNA Index System*”) e é constituída por 13 *loci* STR nucleares que permitem a determinação de um perfil genético, suficientemente discriminativo e que possibilita a identificação genética individual. A base de dados em Portugal surgiu apenas como projeto legislativo em 2006 através de Despacho do Ministro da Justiça [6, 9].

Atualmente, para a genotipagem destes *loci* são utilizados *kit's* comerciais que permitem a obtenção de resultados bastante satisfatórios, inclusivamente em amostras degradadas, aos quais será feita referência posteriormente [7].

No conjunto dos STR existe ainda um subgrupo, designado de mini-STR, caracterizados por apresentarem tamanhos inferiores a 150 pb. A utilização de mini-STR mostra-se vantajosa, sobretudo na identificação de restos cadavéricos, e/ou amostras degradadas [7, 10].

Nos casos em que a análise de DNA é feita com amostras degradadas, estudos demonstraram que a obtenção de resultados se torna mais eficiente quando são analisados produtos da PCR mais pequenos ( $\approx 10$  a 12 pb). Alterando o lugar de ligação dos *primers*, aproximando-os da zona de repetição do STR, a informação continua a ser a mesma mas com redução do tamanho dos produtos de amplificação [11, 12, 13, 14, 15].

Os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sendo polimorfismos caracterizados por mutações pontuais, ou seja, pela substituição de um único par de bases, mas que contudo, apresentam uma frequência de pelo menos 1%, em qualquer população escolhida aleatoriamente, têm grande relevância para situações em que o DNA se apresente bastante degradado, podendo também ser utilizados para a distinção genética de populações e para o estudo da história geográfica das mesmas. O factor limitante reside no seu poder de discriminação em que, para que o mesmo possa ser idêntico ao dos STR, será necessário um número mais elevado de SNP [6, 8, 10, 16].

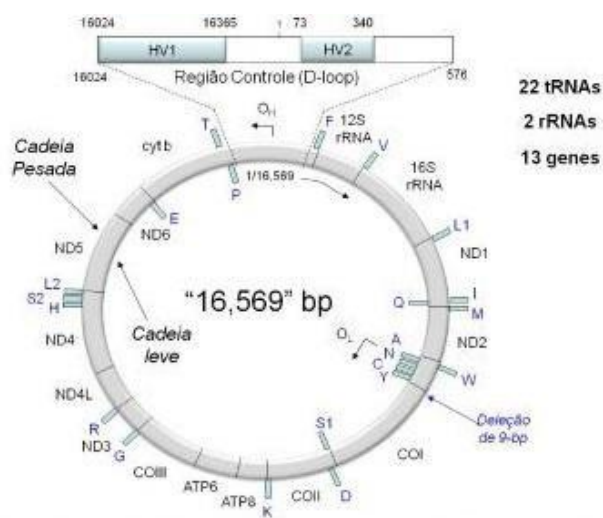
#### 1.1.2 DNA mitocondrial em contexto forense

Apesar da pequena dimensão da molécula de mtDNA (DNA mitocondrial), a densidade génica é bastante elevada, com 93% do genoma codificante – região codificante – (cerca de 15500 pb) e com 7% do genoma não codificante – região controlo – (aproximadamente 1100 pb), onde se encontram as regiões hipervariáveis (HVR). Estas regiões têm interesse para a Genética Forense por apresentarem um elevado grau de polimorfismo [6, 17, 18, 19].

Na região controlo são reconhecidas as regiões hipervariáveis I e II (HVI e HVII respetivamente), de maior relevância na rotina forense e já descritas na literatura (**Figura 1.1**), existindo um terceiro segmento, a região hipervariável III (HVIII), que não sendo tão polimórfica, tem vindo a ser explorada e utilizada de forma a aumentar o poder de discriminação entre indivíduos. As regiões HVI, HVII e HVIII localizam-se entre as posições 16024 a 16365 pb, 73 a 340 pb e 438 a 574 pb, respetivamente. No entanto, existem atualmente muitos laboratórios a realizar a sequenciação da região controlo na sua totalidade [20, 21, 22, 23, 24].

Na avaliação de dados e interpretação de resultados na análise de mtDNA estabeleceram-se “*guidelines*” com aplicação universal, uma vez que, a análise das sequências era muito morosa, dando lugar à necessidade de padronizar e simplificar. As normas descritas pelas “*guidelines*” consistem na comparação das diversas sequências de mtDNA em estudo com a sequência *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), denominada sequência padrão.

Executa-se, depois, o alinhamento das referidas sequências e os resultados são indicados através das diferenças existentes relativamente à sequência padrão [25, 26, 27].



Embora o mtDNA não seja considerado a escolha primordial para a identificação individual humana, o mesmo apresenta múltiplas particularidades ímpares que o reconhecem como elemento de interesse em perícias forenses. Para casos de identificação, tanto de restos cadavéricos, como criminais, que envolvam o estudo da relação de parentesco, verifica-se bastante favorável a análise de mtDNA para a sustentação da hereditariedade uniparental materna. Em perícias, nas quais a quantidade de DNA se verifique mínima e/ou o DNA esteja muito degradado (p.ex. ossos, dentes e pelos), o mtDNA apresenta-se também como uma alternativa vantajosa. Nos casos em que o exame se reduza a amostras de restos cadavéricos ancestrais ou provenientes de catástrofes, a análise de mtDNA pode ser muito útil. [2, 3, 23, 24, 28, 29].

Todavia, a aplicação de mtDNA pode também apresentar limitações, sendo exemplos disso a hereditariedade uniparental materna. Uma vez que, sendo o mtDNA herdado apenas pela via materna, não permite fazer a distinção entre indivíduos dessa mesma linhagem [17, 18]. A heteroplasmia, que pode ocorrer no mtDNA, não invalidando o seu uso, pode contudo, dificultar a interpretação de resultados, com o aumento da complexidade na análise de perfis. A mesma define-se pela possibilidade de ocorrerem mutações durante a replicação e segregação, de forma independente, de um conjunto de moléculas de mtDNA e surgindo o aparecimento de mais do que um tipo de genoma mitocondrial no mesmo indivíduo.

Esta pode ser de dois tipos diferentes:

- (1) Heteroplasmia de posição, quando a diferença entre os tipos de mtDNA se encontra apenas num nucleotídeo em determinada posição, ou
- (2) Heteroplasmia de comprimento, quando se verifica a deleção ou inserção de uma base, o que leva ao aparecimento de tipos de mtDNA com comprimentos diferentes [29, 30].

É de acrescentar que, atualmente, são também já realizados estudos de SNP de mtDNA, a maioria localizados na região codificante, permitindo um aumento do poder de análise do mesmo genoma [32].

Assim, a análise de mtDNA para a obtenção de perfis de DNA deve apenas ser utilizada aquando da impossibilidade de análise de ncDNA ou para obtenção de informação adicional.

## 1.2 PCR em tempo-real

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo-real (rt-PCR), descrita pela primeira vez em 1993 por *Higuchi* e seus colaboradores, consiste na monitorização da PCR no decorrer de todos os seus ciclos [33].

No decorrer da última década, foram já criadas e comercializadas, plataformas de instrumentação devido ao seu rápido sucesso [34].

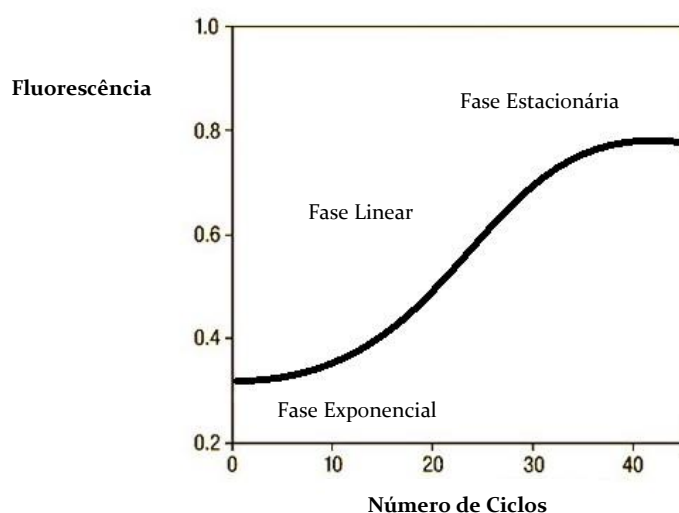
Sendo o procedimento da técnica da rt-PCR semelhante ao da técnica da PCR convencional, a sua vantagem está na possibilidade de quantificar em tempo real (como o próprio nome indica) o DNA amplificado em cada ciclo da PCR. É de salientar que nesta

técnica a amplificação, detecção e quantificação ocorrem em simultâneo e com total automatização [4, 33].

A PCR está dividida em 3 fases:

- (1) Fase Exponencial,
- (2) Fase de Crescimento Linear e
- (3) Fase Estacionária.

A **Figura 1.2** representa as 3 fases ao longo das quais o sinal de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado [6, 20].



**Figura 1.2** – Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR. Intensidade de fluorescência ( $\Delta R_n$ ) vs nº de ciclos da PCR.

Dada a elevada eficiência que se evidencia na fase exponencial, devida à relação quantidade de produto amplificado vs DNA inicial, esta é tida como a melhor para o estudo da reação.

A partir da fase de crescimento linear verifica-se um decréscimo na eficiência pois, com o consumo de reagentes, a disponibilidade dos mesmos vai diminuindo, obtendo-se uma produção linear e um aumento da fluorescência.

Na última fase, existe uma estagnação da reação devida à inexistência ou esgotamento de reagentes utilizados nas fases anteriores, de tal forma que a elaboração de novos produtos da PCR deixa de ser possível [6, 33].

É necessário definir alguns conceitos para interpretação dos resultados possíveis de obter através da rt-PCR. São eles:

- (1) *Baseline*,
- (2) *Threshold*,
- (3) *Cycle Threshold* ( $C_T$ ) e
- (4) *Eficiência* (E).

Na literatura, a *Baseline* é definida como o “limiar de detecção de fluorescência do equipamento”, sendo assim, uma função linear que serve para eliminar o “ruído de fundo”.

O *Threshold* é designado como o “valor selecionado quando a PCR inicia a fase exponencial de crescimento”. É um ponto definido arbitrariamente pelo *software* do equipamento, em função da *baseline*. Por outras palavras, é possível dizer que o *threshold* é um ponto de partida a partir do qual a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase exponencial, sendo o *Cycle Threshold* ( $C_T$ ) o valor relativo aos ciclos em que a curva de amplificação ultrapassa o valor limite selecionado. O valor de  $C_T$  depende do número de moléculas de DNA disponíveis para amplificação, o que significa que quanto maior for o número de moléculas inicial, maior será o número de ciclos ( $C_T$ ) necessários para que seja gerado proporcionalmente um maior exponencial do sinal de fluorescência ( $R_n$ ) (superior à *baseline*) [6, 33, 34, 35].

A **Tabela 1.2** apresenta os valores esperados para  $C_T$  consoante as quantidades de DNA inicial presentes para a amplificação.

**Tabela 1.2** – Valores de  $C_T$  vs Quantidade de DNA (Adaptado de *Butler, 2005*).

Valor $C_T$	Quantidade de DNA
$\leq 29$	Abundante
30 a 37	Moderada
38 a 40	Mínima



A Eficiência (E) é a medida que corresponde à taxa de amplificação por PCR, permitindo determinar o sucesso da técnica [16, 29].

Contudo, é necessário dizer que, existem vários factores que podem influenciar e alterar a eficiência, sendo exemplos disso a presença de inibidores da PCR (p.ex. hemoglobina), a presença de promotores da PCR (p.ex. BSA), a qualidade dos *primers* utilizados, do estado de degradação do DNA, entre outros [19, 36, 37].

Para que a análise dos produtos da amplificação por rt-PCR possa ocorrer, é necessária a utilização de compostos químicos com fluorescência. Neste âmbito, existem diversos progressos e metodologias disponíveis. A monitorização da fluorescência média é feita em tempo real, através de um computador ligado ao equipamento [38, 39].

No que diz respeito aos métodos químicos de fluorescência, utilizados na rt-PCR, e sendo estes bastante diversificados, apresentam em comum o uso de um composto fluorescente em que, o sinal é detetado ao longo do percurso no termociclador por um *laser* presente no mesmo. No entanto, os métodos encontram-se agrupados em duas categorias distintas, consoante a forma de atuação do composto: corantes intercalares e sondas de sequência específica [6, 37, 41].

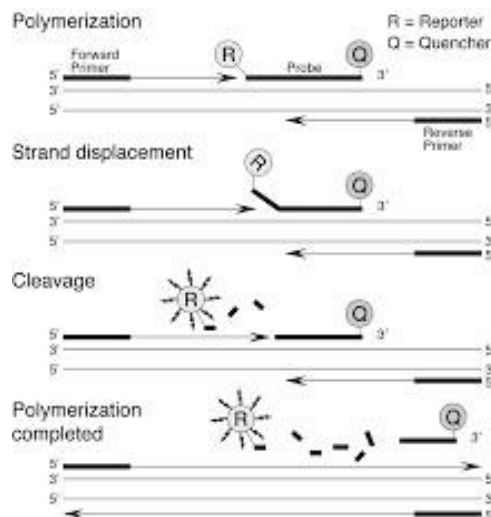
Sendo as sondas de sequência específica as mais interessantes para este estudo, estas definem-se pela adição às mesmas de um fluorocromo. Estas sondas são específicas para uma determinada sequência de DNA que é detetada em exclusivo. No grupo destas sondas encontram-se as *Sondas TaqMan®*, às que dedicaremos a atenção [6, 34, 36].

#### - *Sondas TaqMan®*

O funcionamento destas sondas baseia-se na deteção da atividade exonucleotídica 5'-3' da Taq polimerase, com a utilização de dois *primers* específicos de uma determinada sequência de DNA e uma sonda *TaqMan®* homóloga à região do fragmento de DNA entre os *primers*. É característica desta sonda, apresentar na extremidade 5' um fluorocromo *reporter* e na extremidade 3' um *quencher* (molécula que recebe a energia da molécula *reporter*, dissipando-a em forma de luz ou calor) [33, 34, 42, 43].

Como é possível observar na **Figura 1.3**, através da transferência de energia é anulada a deteção da fluorescência da molécula *reporter*, devido a proximidade física entre esta e o *quencher*. Posteriormente à fase de hibridação da PCR, onde as sondas se ligam às sequências alvo com quem têm complementaridade, ocorre a hibridação da sonda *TaqMan®* com a sua sequência específica (entre os *primers*), sendo depois detetada pela enzima Taq polimerase que a vai então hidrolisar através da sua atividade exonucleotídica 5'-3'. É através deste processo

que se evidência a separação do *quencher* da molécula *reporter*, permitindo que a fluorescência emitida por esta seja detetada (**Figura 1.3**) [33, 43].



**Figura 1.3** – Representação da tecnologia TaqMan®

(Adaptado de guidelines da *Applied Biosystems* “TaqMan Universal PCR Master Mix”).

Como grande vantagem apresentada por esta tecnologia destaca-se a especificidade para a amplificação, detecção e quantificação de uma sequência alvo pretendida. Sendo também rápida e bastante precisa, apresentando ainda um risco de contaminações muito reduzido. Permite ainda que sejam realizados diversos tipos de análises em simultâneo [8, 33, 41, 43].

## Análise de resultados

Para análise dos resultados obtidos através da rt-PCR é efetuado um estudo das curvas *melting* onde se encontra representada a temperatura em função da fluorescência, dependendo as mesmas do tamanho e da composição das bases do produto amplificado. Por definição, realizam-se aumentos sucessivos de temperatura nos poços de reação até ao limite em que se observa a desnaturação do DNA, perdendo-se assim a fluorescência; esta temperatura é designada por temperatura de *melting* ( $T_m$ ). A  $T_m$  em cada produto está dependente do conteúdo de guanina e citosina (G+C), comprimento e características da sequência.

Como vantagens deste tipo de análise apresenta-se a possibilidade de distinção de diversos produtos da PCR, dada a sua elevada especificidade. Verifica-se também a possível

diferenciação de produtos específicos de inespecíficos, com a caracterização de polimorfismos (inserção/deleção), genotipagem de SNP e detecção de mutações [19, 34].

### 1.3 Quantificação de DNA

Os avanços tecnológicos relativamente à análise forense de DNA têm vindo a progredir, obtendo-se resultados com grande êxito, numa ampla variedade de materiais biológicos e até mesmo em mistura dos mesmos [44].

É contudo importante referir que as quantidades de DNA presentes nas diversas amostras não é sempre igual, podendo o estado em que as amostras se encontram também variar muito, o que pode interferir com o sucesso da análise a efetuar. Deste modo, independentemente da metodologia a utilizar para a análise de DNA, o processamento prévio das amostras tem uma influência relevante. Desde a recolha do material, à sua seleção e sua quantificação, não esquecendo as etapas intermédias, todas são fases de grande relevância para a obtenção de resultados válidos [41, 45, 46].

Após a extração do DNA, segue-se a sua quantificação. A quantificação de DNA humano, sendo um procedimento visado pelo *DNA Advisory Board*, serve para assegurar, antes de mais, que a quantidade presente numa amostra é a aconselhada para posterior amplificação pela PCR, possibilitando assim que seja apenas utilizada a quantidade mínima de DNA para análise [6, 42, 45].

Como mencionado anteriormente, o estado das amostras pode influenciar a sua análise. Em amostras com DNA degradado e/ou com baixo número de cópias do mesmo, a quantificação permite ao perito a possibilidade de decidir qual o DNA a estudar (ncDNA ou mtDNA) e a obtenção de informação relativamente a contaminações/inibidores presentes nas amostras [6, 41, 47].

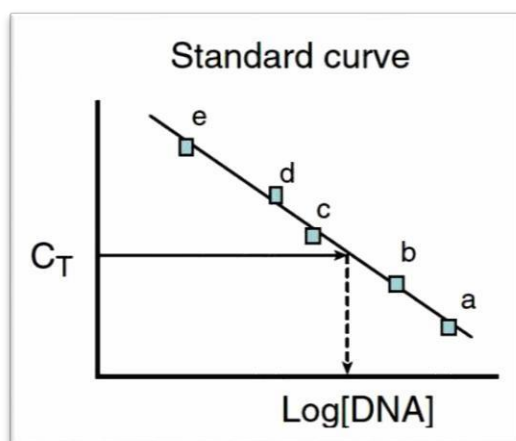
A análise de DNA pela PCR é feita preferencialmente utilizando *kit's* comerciais, uma vez que estes foram concebidos para este tipo de análise e estão otimizados para permitir a obtenção de resultados válidos. Sendo estas análises bastante sensíveis, a quantificação de DNA presente numa amostra é importante para a seleção da quantidade a utilizar, uma vez que estes *kit's* têm predefinido um intervalo de concentrações de DNA no qual existe maior eficácia [6, 8].

A obtenção, desde início, de uma quantidade ideal de DNA para análise de amostras pelos *kit's* comerciais leva a que não seja necessário efetuar repetições, o que se reflete não só na diminuição de tempos de análise mas também nos custos, não esquecendo ainda a escassez de amostra que por vezes também é limitante. Atualmente, o uso da rt-PCR para quantificação é cada vez maior, sendo um método de grande sensibilidade e de baixo custo [6, 37, 38].

Através da rt-PCR é possível quantificar o DNA de duas formas distintas: pela forma Relativa ou pela Absoluta, sendo a metodologia aplicada a de comparação do limiar da fase exponencial e a de curva padrão, respetivamente [20, 34].

Para a quantificação relativa, em que é utilizada a comparação do limiar da fase exponencial (*threshold*), é feita uma comparação dos valores de  $C_T$  das amostras alvo com uma amostra controlo, sendo os valores de ambos normalizados a partir de um gene endógeno que seja apropriado [19, 33, 34].

A quantificação absoluta, baseia-se na determinação da concentração inicial de uma amostra, a partir de uma curva padrão, obtida através de vários ensaios em amostras com concentração conhecida. Assim, a quantificação absoluta por rt-PCR destaca-se pela precisão e consistência dos resultados obtidos. A **Figura 1.4**, representa um exemplo de uma curva padrão, a partir da qual se calcula a concentração de amostras a testar [34, 47].



**Figura 1.4** – Curva padrão obtida por sucessiva análise de amostras com concentrações de DNA conhecidas (de (a) a (e)) (Adaptado de *Butler, 2005*).

## 1.4 Kit's para análise de fragmentos de DNA

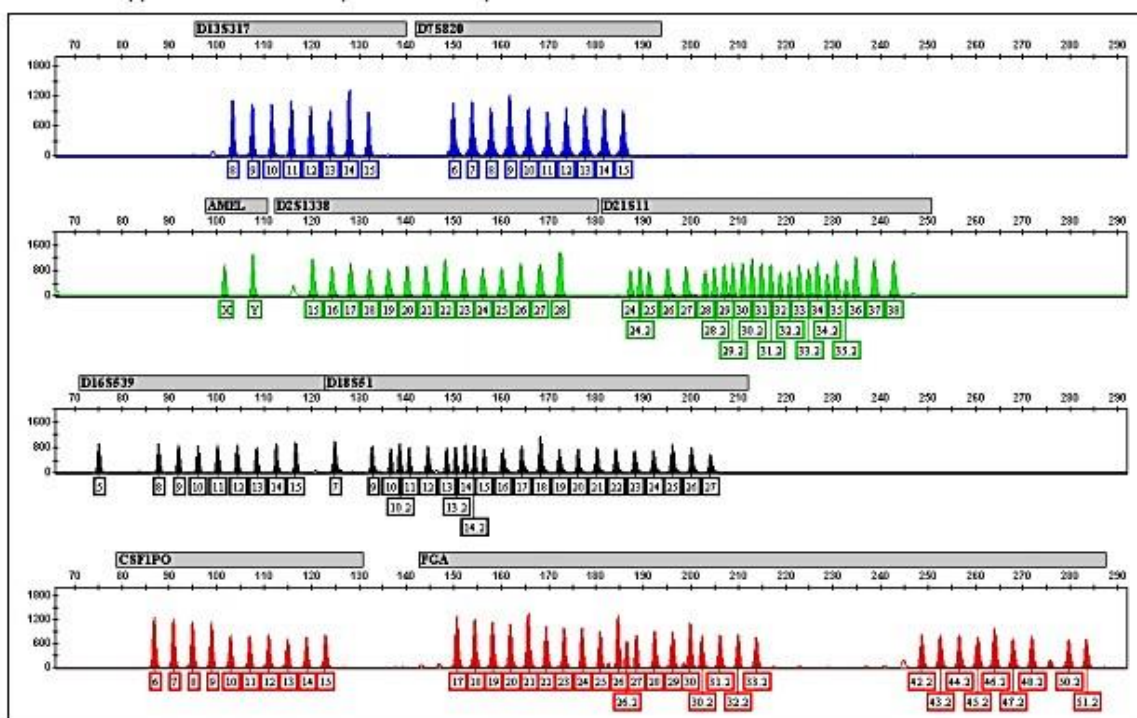
Existem, neste momento, vários *kit's* comerciais para obtenção de perfis de DNA, os quais apresentam na sua constituição um conjunto de *loci* de STR (**Tabela 1.3**).

**Tabela 1.3** – Tabela representativa de alguns *loci* utilizados nos *kit's* comerciais para a obtenção de perfis de DNA (Adaptado de *Butler, 2007*).

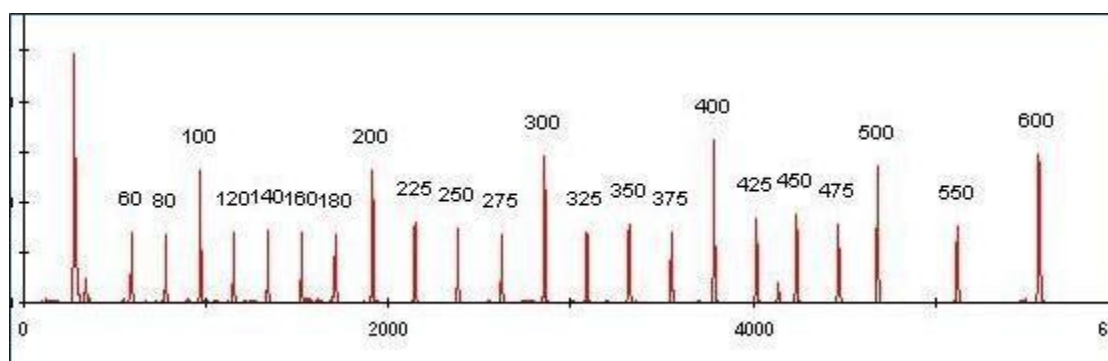
STR Loci	Chromosomal Location	Repeat Motif	Allele Range <sup>a</sup>	PCR Product Sizes in Identifier Kit (dye label)
<i>CSF1PO</i>	5q33.1	TAGA	6–15	305–342 bp (6-FAM)
<i>FGA</i>	4q31.3	CTTT	17–51.2	215–355 bp (PET)
<i>TH01</i>	11p15.5	TCAT	4–13.3	163–202 bp (VIC)
<i>TPOX</i>	2p25.3	GAAT	6–13	222–250 bp (NED)
<i>VWA</i>	12p13.31	[TCTG] [TCTA]	11–24	155–207 bp (NED)
<i>D3S1358</i>	3p21.31	[TCTG] [TCTA]	12–19	112–140 bp (VIC)
<i>D5S818</i>	5q23.2	AGAT	7–16	134–172 bp (PET)
<i>D7S820</i>	7q21.11	GATA	6–15	255–291 bp (6-FAM)
<i>D8S1179</i>	8q24.13	[TCTA] [TCTG]	8–19	123–170 bp (6-FAM)
<i>D13S317</i>	13q31.1	TATC	8–15	217–245 bp (VIC)
<i>D16S539</i>	16q24.1	GATA	5–15	252–292 bp (VIC)
<i>D18S51</i>	18q21.33	AGAA	7–27	262–345 bp (NED)
<i>D21S11</i>	21q21.1	[TCTA] [TCTG]	24–38	185–239 bp (6-FAM)
<i>D2S1338</i>	2q35	[TGCC] [TTCC]	15–28	307–359 bp (VIC)
<i>D19S433</i>	19q12	AAGG	9–17.2	102–135 bp (NED)
<i>Amelogenin</i>	Xp22.22 Yp11.2	-	-	X = 107 bp (PET) Y = 113 bp (PET)

Os *kit's* comerciais são constituídos por uma mistura, designada *master mix*, a qual contém a polimerase, tampões enzimáticos e os dNTP's. Fazem ainda parte dos *kit's*, os *allelic ladders* e os *internal size standards* (**Figura 1.5**), responsáveis pela calibração dos tamanhos dos produtos da PCR para o número de repetições de STR para fins de genotipagem, assim como, para determinar a precisão de cada análise numa eletroforese capilar, respetivamente [45, 46].

(A)



(B)



**Figura 1.5** – Exemplo de um *allelic ladder* (A) e de um *internal size standard* (B)  
 (Adaptado de: <http://www.biosyn.com/sample-preparation-kit/product/internal-lane-standard-60bp-600bp-rox-for-abi-genetic-analyzer.aspx> a 19.06.2016 e Minifiler™ Guide User, 2012).

Estes *kit's* permitem simplificar a obtenção do perfil de STR, possibilitando a uniformização de resultados para posterior partilha entre instituições quer nacionais, quer internacionais.

O processo de tipagem de DNA, como já referido anteriormente, é iniciado através da recolha e seleção do material biológico, para posterior extração de DNA da amostra, quantificação e amplificação pela PCR. De seguida é feita uma separação por tamanho de

fragmentos, através da electroforese capilar, finalizando-se com uma análise dos resultados e obtenção do perfil genético [48].

### Complicações associadas a análise de fragmentos

Na obtenção de um perfil genético, muitas vezes ocorrem problemas designados por artefactos [6, 35], nos quais se incluem:

- (1) Picos +A/-A (*split peaks*): que podem ocorrer devido a adenilações incompletas, nestes é possível a visualização de um pico menor junto ao pico que realmente corresponde ao fragmento;
- (2) Picos Stutter: que podem resultar da amplificação de microssatélites, onde se verifica uma unidade de repetição mais curta, em conformidade com o alelo principal. A probabilidade de surgir este tipo de artefacto aumenta com o aumento do tamanho dos alelos e/ou com o aumento do tamanho das unidades de repetição;
- (3) Drop-Out de alelos: que podem ocorrer devido a uma falha de amplificação de *loci*/alelos. A probabilidade de ocorrência deste tipo de artefactos aumenta com a diminuição da quantidade de DNA utilizada para análise ou devido à sua degradação. A presença de inibidores e/ou contaminantes na amostra também podem influenciar o aparecimento de artefactos deste tipo;
- (4) Sinal Off Ladder: que pode surgir sobretudo devido às características da amostra ou devido ao *internal size standard*. Estes artefactos estão dependentes da voltagem, da oscilação de temperaturas, e dos corantes (fluorocromos) utilizados [6, 11, 35].

## II – JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS

---



## II – JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS

A quantificação de DNA humano (nuclear e/ou mitocondrial) é um procedimento de bastante relevância, uma vez que permite melhorar e definir a metodologia protocolar mais adequada a cada caso, no âmbito de análises forenses, possibilitando que factores tidos como limitantes possam ser ultrapassados. A quantificação permite seleccionar, de forma mais segura, o passo a seguir na análise de determinada amostra de DNA, ou indicar a quantidade óptima de DNA extraído a ser utilizada nessa análise. Deste modo, a quantificação tem vindo a revelar-se uma ferramenta muito útil na área da Genética Forense.

A realização da quantificação através da PCR em Tempo-Real tem-se evidenciado como uma forma de análise preferencial em comparação com outras técnicas de quantificação.

Neste estudo, pretendeu-se avaliar uma metodologia protocolar utilizando a PCR em Tempo-Real para quantificar o DNA, tanto nuclear como mitocondrial (em separado e/ou em simultâneo), passível de reprodutibilidade e em cumprimento de todos os requisitos exigidos na prática pericial na área da Genética Forense. Esta avaliação foi feita utilizando diferentes tipos de amostras forenses, em diversos estados de degradação, pretendendo-se assim usar a quantificação como meio de seleção do protocolo mais adequado à obtenção de perfis genéticos valorizáveis.

### III – MATERIAL E MÉTODOS

---

### III – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Colheita e descrição das amostras utilizadas

As amostras de sangue e zaragatoas bucais utilizadas neste estudo foram colhidas previamente (entre 2002 e 2010) em voluntários anônimos. As amostras de cabelos foram colhidas em 2015. Todas as colheitas foram realizadas no Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Norte.

Foram utilizados 3 tipos diferentes de material biológico humano: sangue, células epiteliais bucais e cabelos.

As amostras de sangue foram colhidas por punção utilizando uma lanceta e efetuando-se a mancha em cartão apropriado (*Human ID Bloodstain card, Whatman™*). As amostras de células epiteliais bucais foram recolhidas utilizando zaragatoas específicas (*Sterile OmniSwab, Whatman™*). Após a colheita todas as amostras foram armazenadas a -20 °C.

As amostras de cabelos foram colhidas manualmente, utilizando uma pinça, a partir de peças de roupa onde estes se encontravam caídos. Posteriormente, foram colocados em tubos de 1,5 mL ou em pequenos envelopes de papel de celofane. Na sua maioria, os cabelos obtidos para análise encontravam-se em fase de telogénese (fase de queda).

#### 3.2 Extração de DNA das amostras

##### 3.2.1 Sangue e células epiteliais bucais

A extração de DNA das amostras de referência foi feita utilizando o método Chelex® 100 [49]. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

### 3.2.2 Cabelos

Recorreu-se à microscopia ótica para verificar a ausência/presença do bolbo nos cabelos. Nos casos em que se verificou a presença do bolbo, deu-se preferência à realização da extração de DNA na região do cabelo constituída pelo mesmo.

A extração de DNA foi realizada usando o kit “*Tissue and Hair Extraction*” e o kit “*DNA IQ™ System*” (ambos da *Promega*). O protocolo utilizado foi o descrito pelo fabricante [50]. Após extração as amostras de DNA foram conservadas a -20 °C até posterior utilização.

## 3.3 Quantificação de DNA por PCR em tempo-real

Avaliou-se a quantificação de DNA através de dois métodos distintos: ensaio “*TaqMan® Universal Master Mix*” e kit “*Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit*”. O equipamento utilizado para a quantificação foi o “*7500 Real-Time PCR System*” da *Applied Biosystems*.

Procedeu-se em cada método a um estudo de sensibilidade com concentrações de DNA<sub>Total</sub> entre 30 ng/μl e 0,00625 ng/μl utilizando o padrão *DNA K562* da *Promega*.

### 3.3.1 Ensaio *TaqMan® Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*)

#### Elaboração do Padrão para a Curva de Calibração

A quantificação das amostras de DNA é realizada por comparação com uma curva padrão (curva de calibração). A mesma foi efetuada com base na correspondência de DNA<sub>Total</sub> com o ncDNA e o mtDNA. Não existindo padrões de mtDNA, a curva de calibração foi feita a partir do padrão de ncDNA e calculou-se, *a posteriori*, a quantidade de mtDNA para cada um dos pontos. Para a realização dos cálculos, utilizou-se a fórmula descrita por *Butler* (2004). Na **Tabela 3.1** apresentam-se os valores das diluições padrão utilizados.

**Tabela 3.1** –Diluições padrão “*TaqMan®Universal Master Mix*” utilizadas.

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
<b>ncDNA</b> <b>(ng/μL)</b>	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
<b>mtDNA</b> <b>(pg/μL)</b>	28	14	2,8	1,4	0,28	0,14	0,028	0,0028
<b>Quantidade de DNA (μL)</b>	Stock	5 (STD1)	2 (STD2)	5 (STD3)	2 (STD4)	5 (STD5)	2 (STD6)	1 (STD7)
<b>Quantidade de Água (μL)</b>	0	5	8	5	8	5	8	9

V<sub>f</sub> das Diluições = 10 μL

**A. Método de Quantificação por ensaio “*TaqMan®Universal Master Mix*” para mtDNA.**

Realizou-se a quantificação de um fragmento de 287 pb da região hipervariável I– HVI de mtDNA. A mesma foi executada segundo o protocolo descrito em **Anexo I – A1** [38].

A sonda e os *primers* utilizados para a quantificação encontram-se descritos no artigo *Alonso et al.* (2004) e na **Tabela 3.2**.

**Tabela 3.2** – Sequência da sonda e *primers* descritos para o mtDNA, por *Alonso et al.* (2004).

	Sequência (5'-3')
<b>Primers</b>	
L16131	CAC CAT GAA TAT GTA GGT
H16379	CAA GGG ACC CCT ATC TGA GG
<b>Sonda</b>	
mt287 MGB	6-FAM - CAA GCA AGT ACA GCA A - MGB

**- Modificações da PCR para quantificação de mtDNA de interesse nas amostras em estudo.**

Foi necessário modificar o protocolo de amplificação, dada a existência de material genético para quantificar, no entanto o aparelho não efetuou a sua detecção.

Realizou-se a PCR convencional, sem aplicação de sonda, conforme descrito na **Tabela 3.3** para confirmar se os *primers* estariam viáveis para utilização. As condições utilizadas no termociclador encontram-se descritas na **Tabela 3.4**.

**Tabela 3.3** – Alterações efetuadas no protocolo de quantificação de mtDNA.

Alterações	
1.	<i>Hot Start Taq® Plus Master Mix (Qiagen)</i>
2.	Parâmetros termociclador - Aumento para <b>15 min</b> no passo de <b>desnaturação inicial</b>
3.	Parâmetros termociclador – Aumento da temperatura na <b>extensão final</b> <b>72 °C</b> durante <b>10 min</b>
4.	Concentração dos <i>primers</i> – Aumento para <b>150 nM</b> , <b>200 nM</b> e <b>10 µM</b>

**Tabela 3.4** – Condições para a PCR convencional.

PCR Convencional		
95 °C	15 min	40x
95 °C	15 seg	
60 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Os produtos amplificados foram sujeitos a electroforese horizontal durante 15 min a uma voltagem de 200 V, em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 1x e corados com 2 µL de brometo de etídio. Os volumes aplicados no gel foram de 3 µL de *loading buffer* ((*Ladepuffer DNA IV* da *Applichem*) o qual se mistura com o DNA por forma a aumentar o seu peso, permitindo que o mesmo se deposite no fundo do poço e que não se dissolva com o tampão) e 3 µL de amostra, o que fez um total de 6 µL.

**B. Método de Quantificação por ensaio “TaqMan®Universal Master Mix” para mtDNA e ncDNA.**

Realizou-se a quantificação de um fragmento de 283 pb de mtDNA e de um fragmento de 246 pb de ncDNA. A mesma foi executada segundo o protocolo descrito em **Anexo I – A2** [39].

Utilizou-se o artigo descrito por *Niederstätter et al.* (2007) para seleção das sondas e *primers* utilizados na quantificação de mtDNA e de ncDNA, tanto em separado como em simultâneo. A **Tabela 3.5** apresenta as seleções efetuadas.

**Tabela 3.5** – Sequência das sondas e *primers* descritos para o ncDNA e mtDNA, por *Niederstätter et al.* (2007).

		Sequência (5'-3')
	<b>Primers</b>	
ncDNA	RB1 80 <i>F</i>	AGG TTG CTA ACT ATG AAA CAC TGG C
	RB1 325 <i>R</i>	CCA TCT CAG CTA CTG GAA AAC ATT C
mtDNA	mt8154 <i>F</i>	GGG TAT ACT ACG GTC AAT GCT CTG A
	mt8436 <i>R</i>	GTG ATG AGG AAT AGT GTA AGG AGT ATG G
	<b>Sondas</b>	
ncDNA	RB1 212 MGB	6-FAM - CAG CAC TTC TTT TGA GCA C - MGB
mtDNA	mt8345 MGB	VIC - CCA ACA CCT CTT TAC AGT GAA - MGB

\* *F* – Referente ao *primer forward* de ligação na direção 3'-5' da cadeia simples de DNA;

*R* – Referente ao *primer reverse* de ligação na direção 5'-3' da cadeia simples de DNA.

A quantificação, neste caso, foi realizada por dois métodos distintos:

***Quantificação de mtDNA e de ncDNA em separado:***

A quantificação foi executada seguindo o protocolo referido anteriormente [39], no entanto foram avaliadas duas misturas em separado; uma para a quantificação de mtDNA e outra para a quantificação de ncDNA, com os respetivos *primers* e sonda.

*Quantificação de mtDNA e de ncDNA em simultâneo:*

Neste caso, e embora seguindo o mesmo protocolo, foi necessário alterar os volumes da mistura para que a quantificação fosse efetuada em simultâneo. A **Tabela 3.6** indica as alterações realizadas.

**Tabela 3.6** – Volumes da reação de quantificação em separado e em simultâneo de ncDNA e mtDNA.

Separado		Simultâneo	
Reagente	Volume (μL)	Reagente	Volume (μL)
Master Mix TaqMan®	12,5	Master Mix TaqMan®	12,5
Primer L1 (100 nM)	1,25	Primer L1 (100 nM)	1,25
Primer H1 (100 nM)	1,25	Primer H1 (100 nM)	1,25
Sonda 1 (200 nM)	2	Primer L2 (100 nM)	1,25
H <sub>2</sub> O	6	Primer H2 (100 nM)	1,25
DNA	2	Sonda 1 (200 nM)	2
		Sonda 2 (200 nM)	2
		H <sub>2</sub> O	1,5
		DNA	2

\*V<sub>f</sub> = 25 μL para ambas as quantificações.

- Modificações da PCR para quantificação em simultâneo de mtDNA e de ncDNA nas amostras em estudo.

Foi também necessário modificar o protocolo de amplificação dos fragmentos 283 pb de mtDNA e 246 pb de ncDNA (em simultâneo) dado que inicialmente, quando se efetuou a quantificação, não se obtiveram resultados relativamente à quantificação de ncDNA. Com o objetivo de otimizar a amplificação em conjunto realizaram-se as alterações listadas no **Tabela 3.7**.



**Tabela 3.7** - Alterações efetuadas no protocolo para quantificação em simultâneo de ncDNA e mtDNA

	Condições iniciais	Alterações
1.	Concentração dos <i>primers</i> de ncDNA - <b>100 nM</b>	Concentração dos <i>primers</i> de ncDNA - Para <b>250 nM e 300 nM</b>
2.	Quantidade de amostra - <b>2 µL</b>	Quantidade de amostra - Aumento para <b>4 µL</b>

Dados os resultados obtidos, optou-se por continuar com o protocolo [39], mas apenas para quantificação do fragmento de 283 pb do mtDNA, com os *primers* e a sonda selecionadas a partir do artigo de *Niederstätter et al.* (2007).

### 3.3.2 Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)

Por forma a realizar a análise da quantificação por PCR em Tempo-Real para ncDNA, utilizou-se o kit “Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit” e seguiu-se o protocolo facultado pelo fabricante [51]. Este é um método que se encontra validado e otimizado no âmbito forense e permite fazer comparação com os outros métodos existentes.

#### Elaboração do Padrão para a Curva de Calibração

Na **Tabela 3.8** estão representados os valores das diluições padrão utilizadas.

**Tabela 3.8** – Diluições padrão “Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit” utilizadas.

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
ncDNA (ng/µL)	50	5	0,5	0,05	0,005
Quantidade de Amostra (µL)	10 Stock	10 (STD1)	10 (STD2)	10 (STD3)	10 (STD4)
Quantidade de <i>Buffer</i> (µL)	10	90	90	90	2
Factor Diluição	2X	10X	10X	10X	10X

Vf das Diluições = 10 µL

### 3.4 Amplificação de ncDNA utilizando *kit's* comerciais

Foi utilizado para a amplificação de ncDNA o termociclador “*GeneAmp PCR System 9700*” (*Applied Biosystems*). Todas as amplificações realizadas, independentemente do *kit* comercial utilizado, contiveram um controlo positivo (efetuado com o padrão *Control 007 DNA* ou o padrão *Control 9947A DNA*), dependendo do *kit* em utilização, e um controlo negativo efetuado com H<sub>2</sub>O (ultra pura).

Os *kit's* comerciais testados, foram utilizados previamente com diferentes concentração de DNA<sub>Total</sub> para a determinação das quantidades ótimas na obtenção de resultados. As concentrações utilizadas foram as mesmas descritas anteriormente para a quantificação (escala de 30ng a 0,000625ng) com a amostra padrão *DNA K562*. Posteriormente o ensaio foi aplicado às amostras em estudo.

#### 3.4.1 *AmpFlSTR® NGM SElect™ (Applied Biosystems)*

No *kit* comercial *AmpFlSTR® NGM SElect™*, são amplificados numa única reação, 16 *loci* STR autossómicos e o *locus* da amelogenina. A amplificação deste fragmento gera produtos de diferentes tamanhos dos cromossomas X e Y, sendo por isso, utilizada para diferenciar sexos. O protocolo seguido foi o descrito pelo fabricante [52], adaptado para utilização de quantidades de reagentes com metade do volume (**Anexo I – A3**).

#### 3.4.2 *PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega)*

O *kit* *PowerPlex® ESI 17 Pro System*, amplifica 16 *loci* STR autossómicos e um fragmento do gene da amelogenina, em reação única (*multiplex*). O protocolo seguido foi descrito pelo fabricante e encontra-se em anexo [53].

#### 3.4.3 *PowerPlex® Fusion System (Promega)*

No *kit* comercial *PowerPlex® Fusion System*, a reação *multiplex* amplifica 22 *loci* STR autossómicos, o *locus* da amelogenina e o *locus* do cromossoma Y, *DYS391*. O protocolo

seguido foi o descrito pelo fabricante [54], adaptado para utilização de quantidades de reagentes com metade do volume (**Anexo I – A4**).

#### 3.4.4 *GlobalFiler™ (Applied Biosystems)*

O kit comercial *GlobalFiler™*, permite a amplificação de 24 loci STR, 21 autossómicos, o locus da amelogenina, o locus Yindel e o locus DYS391. O protocolo seguido foi o descrito pelo fabricante [55].

#### 3.4.5 *AmpFlSTR® MiniFiler™ (Applied Biosystems)*

O kit *AmpFlSTR® MiniFiler™*, amplifica numa única reação 8 loci STR autossómicos e o locus da amelogenina. O protocolo seguido foi o descrito pelo fabricante [56].

Este kit tem a particularidade de aumentar a capacidade de obtenção de resultados de DNA a partir de amostras que se encontram degradadas. Sendo o primeiro kit de mini-STR comercializado, este permitiu a obtenção de resultados interpretáveis através de fragmentos mais reduzidos de STR.

### 3.5 Análise de fragmentos STR

A análise dos fragmentos amplificados foi realizada com recurso à electroforese capilar, utilizando o equipamento “*Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer*” com polímero POP4 (*POP-4™ Performance Optimized Polymer 3500 Series*) e o capilar de 36cm (3500xl-3500 Capillary Array (16x36cm) (*Applied Biosystems*)).

As amostras foram previamente preparadas para a sua posterior análise: adicionou-se 1 µL de produto amplificado a 12,5 µL de Hi-Di™ Formamida (*Genetic Analysis Grade* da *Applied Biosystems*), que funciona como elemento desnaturante e a 0,5 µL de padrão interno (contendo fragmentos de DNA com tamanho conhecidos e que servem para a calibração do equipamento) o qual varia de acordo com o kit em utilização e estando discriminados no

**Anexo I.** Após a desnaturação desta mistura, foi realizada a sua electroforese de acordo com as condições recomendadas pelos fabricantes dos *kit's* comerciais utilizados.

Em anexo (**Anexo I – A5 e A6**) encontram-se informações detalhadas, de acordo com os protocolos utilizados para a análise de fragmentos.

Recorreu-se ao “*GeneMapper® Software v4.0*” (*Applied Biosystems*) para a determinação automática dos fragmentos amplificados, sendo realizada a determinação alélica por comparação com um *ladder* alélico correspondente a cada *kit* comercial.

### 3.6 Análise de mtDNA por sequenciação direta da região HVI e HVII

Para a sequenciação, das regiões hipervariáveis HVI e HVII, de mtDNA, utilizou-se o aparelho *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), com polímero POP6 (*POP-6™ Polymer for 3130 and 3130xl Genetic Analyzers* (7ml)) e o capilares de 36cm (*3130xl-3100 Capillary Array* (16x36cm)). O protocolo seguido encontra-se em anexo (**Anexo I – A7 e A8**). De ressaltar que a sequenciação direta de mtDNA apenas foi realizada na amostra de DNA controlo – *DNA K562*, relativamente a concentrações entre os 30 e 0,0025 ng.

A análise da sequenciação foi realizada automaticamente através do *DNA Sequencing Analysis Software v.3.7*.

Realizou-se a posterior comparação das sequências obtidas com a sequência referência (rCRS) no *Sequence Scape Software v.2.0* (*Applied Biosystems*). Esta comparação carece de verificações e revisões efetuadas pelo operador aquando da análise, de acordo com regras definidas pelo ISFG (“*International Society for Forensic Genetics*”) e grupos de mtDNA.

## IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

## IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de obter informação sobre o protocolo mais adequado a seguir de acordo com o tipo, qualidade e quantidade de amostras a analisar, realizou-se a quantificação de DNA humano (nuclear e mitocondrial) não só em 3 tipos de amostras biológicas distintas (manchas de sangue, zaragatoas bucais e cabelos), mas também em diversas concentrações do controlo DNA K562 (*Promega*). As quantificações foram realizadas recorrendo ao kit “*Quantifiler®Trio DNA Quantification*” e ao ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”. Posteriormente, e com base nos dados adquiridos através dos resultados das quantificações, foram testados diversos protocolos de amplificação.

Realizou-se a quantificação num total de 100 amostras biológicas. Destas, foram estudadas 62, sendo 27 amostras de manchas de sangue, 10 amostras de zaragatoas bucais e 25 amostras de cabelos. Optou-se por não incluir no estudo as restantes 38 amostras, uma vez que não proporcionaram resultados na quantificação.

### 4.1 Quantificação de DNA

Para as referidas 63 amostras e para as concentrações testadas (entre 30 ng e 0,00625 ng) foram analisados parâmetros como a precisão e sensibilidade.

A quantificação pela rt-PCR, usando o ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”, teve como objetivo a verificação da reprodutibilidade e a possível implementação de um protocolo para a quantificação em simultâneo de ncDNA e mtDNA. Todavia, de acordo com o descrito em seguida, não foi possível a realização da quantificação conjunta de ambos os tipos de DNA.

#### 4.1.1 Quantificação através do procedimento de ensaio pela PCR em tempo-real usando “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”

**A. Protocolo descrito por *Alonso et al.*, 2004.**

Realizou-se a quantificação através do ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”, com a utilização do protocolo de *Alonso 2004*.

Após várias tentativas e não se tendo obtido, contudo, resultados com o protocolo testado (mtDNA), efetuaram-se algumas alterações de forma a torna-lo compatível com a finalidade da sua aplicação no laboratório.

Os resultados não sendo satisfatórios, foram tidas como condições limitantes do protocolo, a fraca qualidade dos *primers* utilizados e/ou erro de construção dos mesmos.

**B. Protocolo descrito por *Niederstätter et al.*, 2007.**

No protocolo efetuado através do ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”, de acordo com o discutido por *Niederstätter 2007*, para a quantificação de ncDNA e mtDNA em simultâneo, foi necessário efetuar algumas otimizações. Após as alterações e continuando a verificar-se limitações na quantificação, optou-se pela aplicação do protocolo somente para a quantificação de mtDNA. A **Tabela 4.1** apresenta as limitações do protocolo de *Niederstätter 2007*, para a quantificação conjunta de ncDNA e mtDNA.

A quantificação de ncDNA foi posteriormente efetuada através do kit “*Quantifiler® Trio DNA Quantification*”, o qual se encontra descrito mais à frente.

**Tabela 4.1** – Resumo das possíveis condições limitantes do protocolo testado, para a quantificação de ncDNA e mtDNA (*Niederstätter 2007*).

**Condições**

---

---

1. Qualidade dos <i>primers</i> utilizados no ncDNA (fraca qualidade, erro de construção, ...);
2. Na quantificação em conjunto do mtDNA com ncDNA a competição dos <i>primers</i> pelas sequências, tornam ineficaz a quantificação para ncDNA, em quantidades tidas como vantajosas.

---

Esta decisão teve em consideração o facto de um dos objetivos deste estudo ser a utilização da menor quantidade de DNA possível para a execução da quantificação, reduzindo desta forma a quantidade inicial de amostra.

Assim sendo, para a realização da quantificação de DNA por ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” e análise da sua eficácia, foi dada prioridade à quantificação de mtDNA, de acordo com a metodologia que demonstrou resultados mais promissores.

#### - Precisão

A precisão é definida como a capacidade de um instrumento obter o mesmo resultado através de diferentes medições, realizadas em condições idênticas.

Para a avaliação do desempenho no ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” e para a quantificação de mtDNA, realizou-se a medição de  $C_T$  nas reações de amplificação pela rt-PCR.

Prepararam-se 8 diluições seriadas de DNA padrão em duplicado e foram realizados 5 ensaios em dias distintos, tendo sido utilizado o controlo *DNA K562 (Promega)* (**Anexo II – Tabela B1**). Na conversão dos valores da concentração de  $DNA_{Total}$  para ncDNA e mtDNA, utilizou-se a fórmula descrita por *Butler 2005*, sendo que se encontram assinaladas na **Tabela 4.2** as conversões realizadas para as diluições padrão e o correspondente número de cópias de mtDNA.

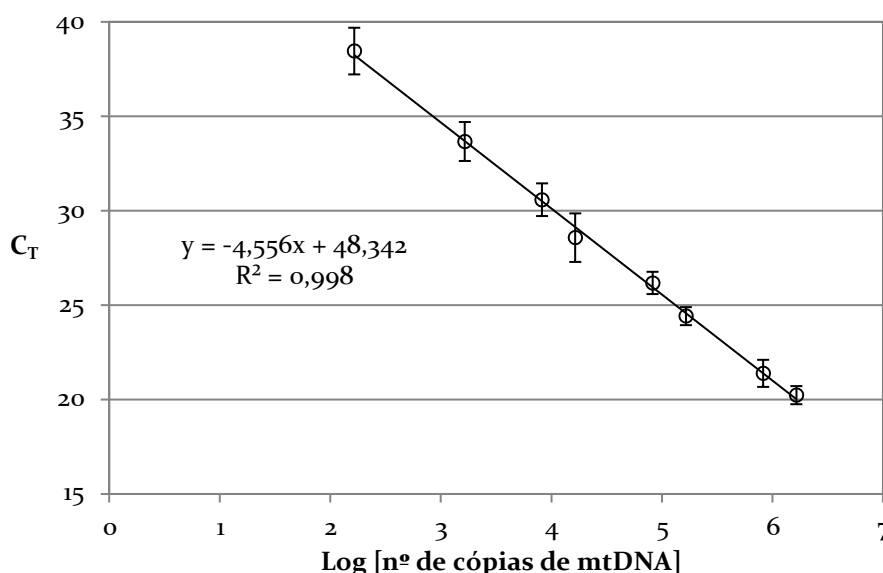
**Tabela 4.2** – Conversão da concentração de ncDNA na concentração de mtDNA e respetivo nº de cópias de mtDNA.

	<i>STD1</i>	<i>STD2</i>	<i>STD3</i>	<i>STD4</i>	<i>STD5</i>	<i>STD6</i>	<i>STD7</i>	<i>STD8</i>
Conc. de mtDNA (pg/μL)	28	14	2,8	1,4	0,28	0,14	0,028	0,0028
Nº de cópias de mtDNA	$1.65 \times 10^6$	$8.24 \times 10^5$	$1.65 \times 10^5$	$8.24 \times 10^4$	$1.65 \times 10^4$	$8.24 \times 10^3$	$1.65 \times 10^3$	$1.65 \times 10^2$

Através dos valores de  $C_T$  registados foram calculadas as respetivas médias e desvios padrão, encontrando-se representados na **Figura 4.1**. Após a análise desta figura, podemos



afirmar que os valores de  $C_T$  são influenciados de acordo com a concentração das amostras, e portanto, de acordo com o número de cópias de mtDNA. Esta relação varia de forma inversamente proporcional (quanto menor é a concentração da amostra, isto é, quanto menor for o número de cópias, maior é o valor de  $C_T$  obtido).



**Figura 4.1** - Correlação dos valores médios de  $C_T$  em função do log do nº de cópias presente nas diluições padrão e o erro que lhes está associado.

Na **Tabela 4.3** estão exibidas as médias dos valores de  $C_T$ , assim como, os desvios padrão e o coeficiente de variação que lhes estão associados.

Da análise conjunta da **Tabela 4.3** com a **Figura 4.1** conclui-se que a reta de calibração apresenta uma boa precisão, uma vez que o coeficiente de variação é inferior a 5%. A curva padrão obtida através das médias dos valores de  $C_T$  apresenta um valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,998.

É também possível verificar que existe um aumento tendencial do valor dos desvios padrão, de acordo com a diminuição da concentração de mtDNA padrão. O valor do desvio padrão médio é de aproximadamente 1  $C_T$ , ou seja, uma pequena oscilação e que se concilia com os resultados do coeficiente de variação. Como descrito na literatura, a relação entre o valor do desvio padrão e a concentração de DNA, poderá ser explicada através de efeitos nas amostras, com quantidades cada vez menores de ncDNA e que são denominados de efeitos estocásticos.

**Tabela 4.3** – Valores obtidos nos diferentes parâmetros analisados, em cada diluição padrão de mtDNA.

Conc. mtDNA (pg/ $\mu$ L)	Nº de cópias de mtDNA	Média C <sub>T</sub>	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
28	1647059	20.2	0.5	2.40%
14	823529	21.4	0.7	3.30%
2.8	164706	24.4	0.5	2.00%
1.4	82353	26.2	0.6	2.30%
0.28	16471	28.6	1.3	4.50%
0.14	8235	30.6	0.9	2.80%
0.028	1647	33.7	1	3.10%
0.0028	165	38.5	1.2	3.20%

A qualidade e estabilidade dos valores obtidos para C<sub>T</sub>, nos 5 dias de análise, permitiram afirmar que, o método testado se verifica preciso e reprodutível.

Por forma a corroborar os dados apresentados, encontram-se descritos em **Anexo II** (Tabela B1, Figura B1 e Tabela B2) a totalidade dos resultados obtidos para este parâmetro.

#### - Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a medida de eficácia, ou seja, a capacidade de detetar uma grandeza.

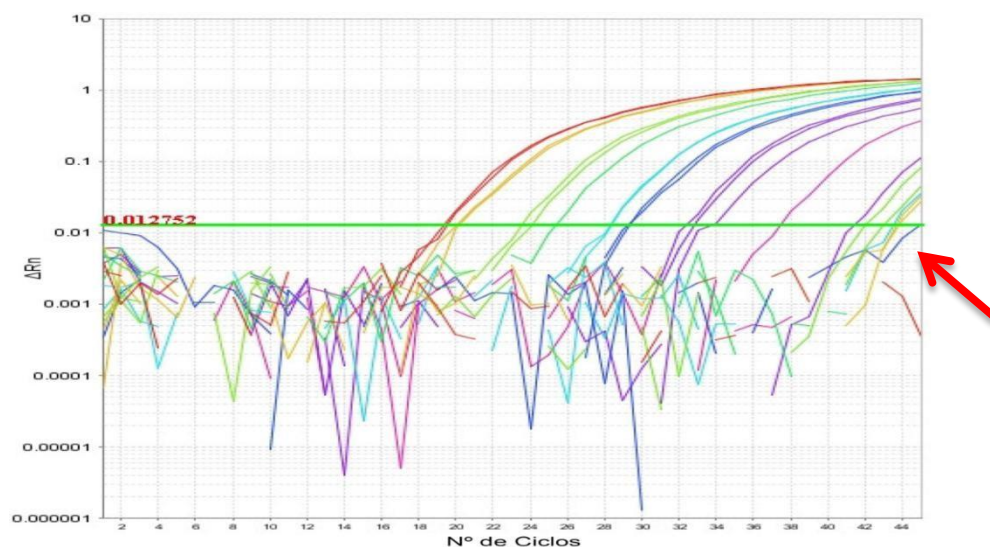
Para a obtenção dos resultados desejados, neste parâmetro, foram analisadas concentrações do controlo *DNA K562 (Promega)* num intervalo entre 30 ng/ $\mu$ L e 0,000625 ng/ $\mu$ L de DNA<sub>Total</sub>, o equivalente a 82,8 pg/ $\mu$ L e 0,0017 pg/ $\mu$ L de mtDNA, respetivamente. Para tal, efetuou-se a sua deteção e quantificação com o ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”.

Decidiu-se realizar um único ensaio de 14 diluições, de modo a limitar a quantidade do reagente “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” utilizado. As concentrações testadas encontram-se apresentadas na **Tabela 4.4**.

**Tabela 4.4** – Concentrações de DNA<sub>Total</sub> testadas para a sensibilidade e respetiva correspondência em mtDNA.

Concentração de DNA <sub>Total</sub> (ng/μL)	Concentração de mtDNA Esperado (pg/μL)
30	82.8
20	55.2
15	41.4
10	27.6
5	13.8
1	2.76
0.5	1.38
0.1	0.28
0.05	0.14
0.01	0.028
0.005	0.014
0.0025	0.007
0.00125	0.003
0.000625	0.002

Nas referidas concentrações, ocorreu amplificação em todas as amostras, com a exceção da que apresenta concentração mais baixa (0,000625 ng/μL), que não atingiu a fase exponencial (**Figura 4.2**).

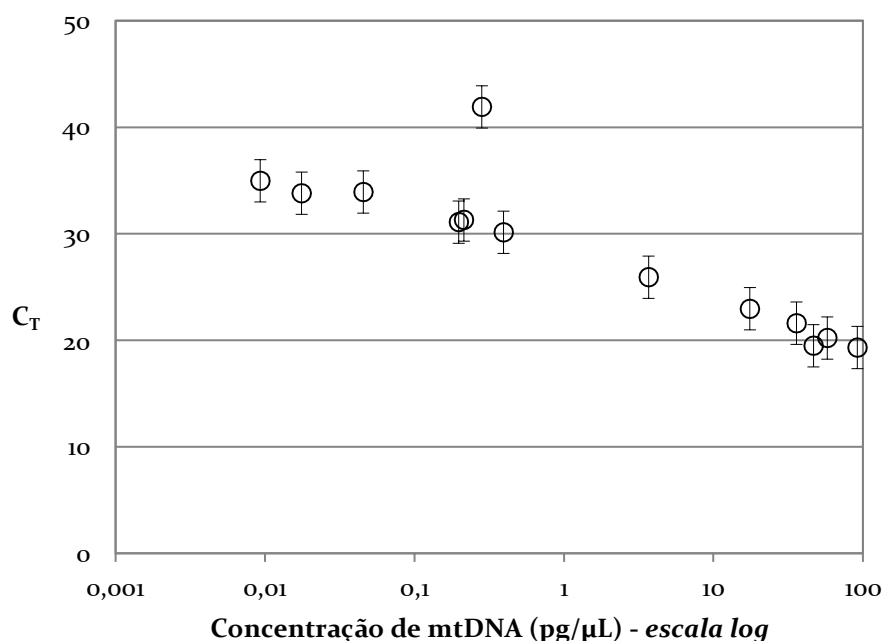


**Figura 4.2** – Gráfico representativo da amplificação/quantificação de mtDNA por rt-PCR, relativa às diversas concentrações testadas do controlo DNA K562 (30 ng/μL a 0,000625 ng/μL de DNA<sub>Total</sub>).

Na **Figura 4.2** encontra-se assinalado (seta a vermelho) a amostra de concentração mais baixa (0,000625 ng/μL), apresentando valores de  $C_T$  abaixo da *baseline*, o que corrobora a ausência de amplificação de ncDNA ou mtDNA nesta concentração. Dada a concentração ser tão reduzida supõe-se que, eventualmente, a mesma não consiga ser detetada para respetiva amplificação. Esta ausência de amplificação de DNA pode estar relacionada com o aumento dos efeitos estocásticos que podem ocorrer com a diminuição da quantidade de DNA a analisar (Alonso, 2004).

Uma vez que não se verificou interferência com os restantes resultados obtidos e por escassez de tempo, não se prosseguiu com os estudos referentes à quantificação do menor valor de concentração de DNA<sub>Total</sub> testado.

Após a observação da **Figura 4.3**, conjuntamente com os dados existentes no **Anexo II (Tabela B3)**, é possível dizer que, para a concentração mais elevada de DNA testado – 30 ng/μL – o valor de  $C_T$  obtido foi de aproximadamente 19, sendo que, a concentração de mtDNA quantificada foi de 47 pg/μL, ou seja, um valor inferior ao esperado. Para o valor mais baixo de concentração de DNA, (0,00125 ng/μL) o valor de  $C_T$  foi de aproximadamente 42, o que corresponde a uma concentração de cerca de 0,28 pg/μL de mtDNA, sendo este valor superior ao esperado.

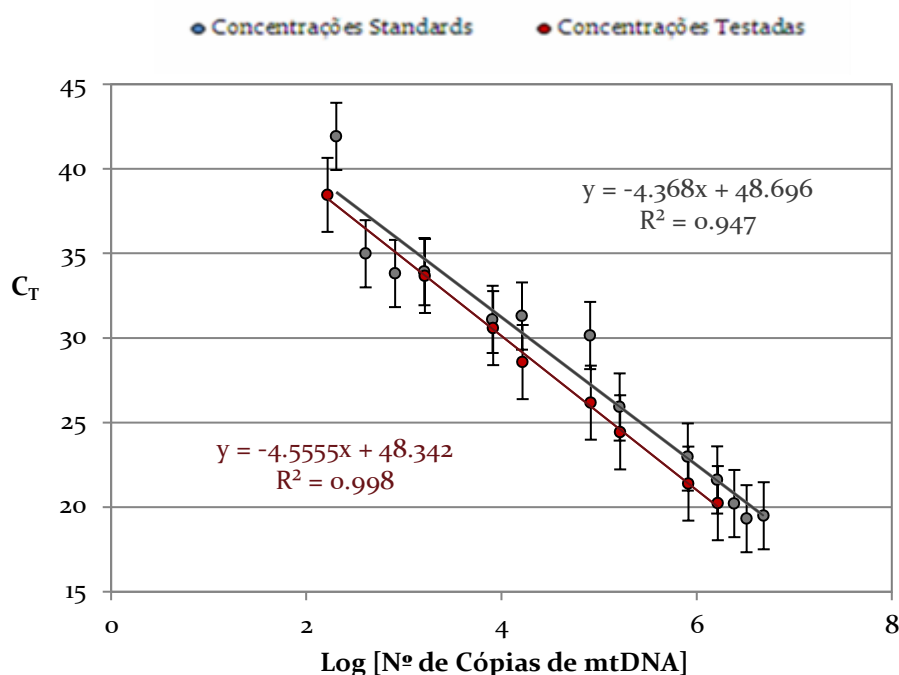


**Figura 4.3** – Gráfico com os valores da concentração de mtDNA em escala log e de  $C_T$ , obtidos para as concentrações testadas através da rt-PCR e o erro padrão associado.

Para a quantificação de mtDNA, calculou-se uma média de 26% relativamente ao respetivo coeficiente de variação (**Anexo II – Tabela B4**).

De acordo com os dados obtidos, verifica-se que é possível efetuar uma comparação entre os resultados do parâmetro da precisão e os resultados do parâmetro da sensibilidade. Na **Figura 4.4** estão representados os gráficos para a precisão e para a sensibilidade através do ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” por rt-PCR.

No que diz respeito à sensibilidade, pode afirmar-se que foi detetada uma relação de linearidade entre as concentrações testadas (para o logaritmo do nº de cópias) e os respetivos valores de  $C_T$ . A curva padrão, referente à série de concentrações testadas, apresenta um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) aproximadamente de 0,95, o que, embora não sendo o ideal, permite a validação dos resultados alcançados. Este valor está relacionado com os resultados obtidos para o coeficiente de variação de cada concentração e a sua respetiva média.



**Figura 4.4** – Correlação da quantidade (nº de cópias de mtDNA) vs  $C_T$ , no estudo da sensibilidade e comparação com resultados obtidos para o parâmetro da precisão.

Com estes resultados, é possível afirmar que a sensibilidade de deteção do ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” para a quantificação de mtDNA se verifica adequada.

Embora não tendo obtido resultados interpretáveis para a menor concentração testada (0,000625 ng/μL), foram porém detetadas e quantificadas concentrações extremamente baixas de DNA, nas amostras estudadas. Como exemplo do atrás referido é a concentração de 00125 ng/μL de DNA, o que é equivalente a 0.0034pg/μL de mtDNA, ou seja, aproximadamente 203 cópias de mtDNA.

Comparativamente, verifica-se que os resultados foram mais precisos no primeiro teste (precisão – **Figura 4.4** - série vermelha) e com menos inconsistências. O facto de se tratar da análise de padrões e de terem sido realizados 5 ensaios distintos, corrobora a menor variabilidade dos resultados, quando comparados com os da sensibilidade. De acordo com estas conclusões, encontram-se os coeficientes de correlação ( $R^2$ ), nos quais se verifica uma maior correlação na série cinza em paralelo com a série vermelha, da **Figura 4.4** (0,998 > 0,947).

Ambos os ensaios demonstraram ser eficientes. Apenas de notar que, teria sido uma mais-valia para o estudo realizado, a concretização de pelo menos um ensaio de confirmação no que diz respeito ao parâmetro da sensibilidade.

#### 4.1.2 Quantificação através do kit “*Quantifiler®Trio DNA Quantification*” pela PCR em tempo-real

Para a quantificação de ncDNA humano recorreu-se ao kit “*Quantifiler®Trio DNA Quantification*” (*Applied Biosystem*).

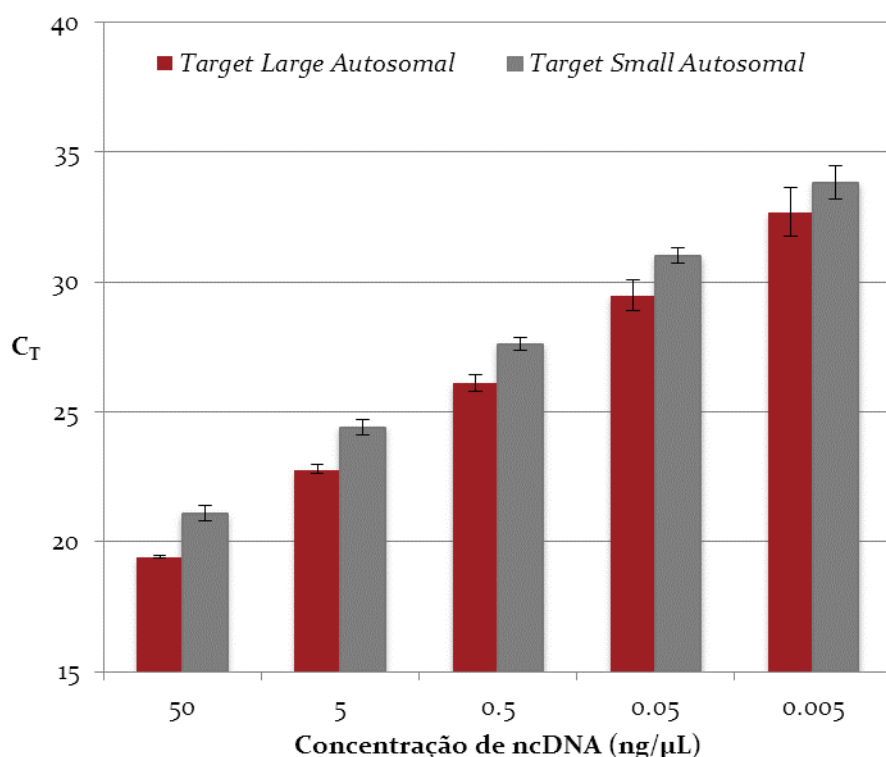
Este kit é atualmente, utilizado para a quantificação de ncDNA humano, direcionando os seus resultados para a obtenção de perfis genéticos de STR. Para além da análise discriminada de grandes e pequenos fragmentos de ncDNA, permite também a deteção da presença de DNA masculino e possui ainda um controle interno (IPC) - sequência de DNA sintético que avalia a presença de inibidores ou outros factores que possam afetar a PCR.

Neste caso também se realizaram estudos relativos à precisão e sensibilidade. Os parâmetros sofreram algumas alterações na sua aplicação, de acordo com a finalidade do kit e a aplicação a ser testada.

#### - Precisão

Na análise da precisão para o kit “*Quantifiler® Trio DNA Quantification*” foram observados os valores de  $C_T$ . Este parâmetro, como referido anteriormente, apresenta grande relevância na quantificação.

Foram efetuadas, em 3 dias distintos, 3 reações idênticas. Em cada reação preparou-se uma série de 5 diluições de solução padrão de DNA (pertencente ao kit em utilização – *Quantifiler® THP DNA Standard*) e quantificou-se em cada reação, as diluições em duplicado. Foram registados os valores obtidos para  $C_T$ , com as respetivas médias e desvios padrão para cada um dos fragmentos amplificados. Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 4.5**, na **Tabela 4.5** e na **Figura 4.6**.

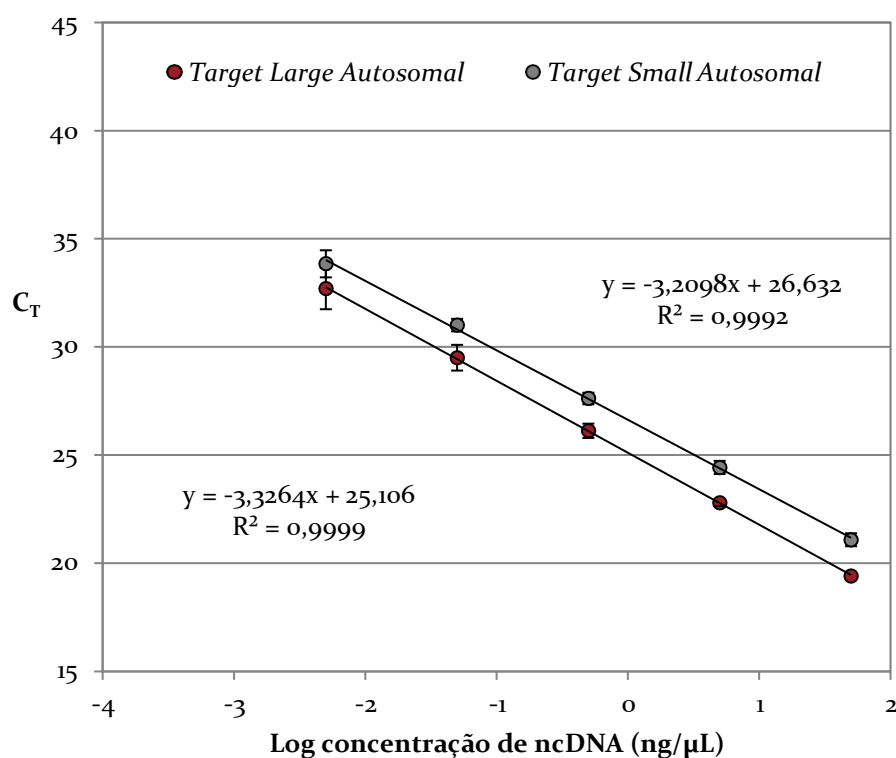


**Figura 4.5** – Valores médios de  $C_T$  e respetivo erro associado, para as diversas concentrações de DNA padrão testadas e alvos selecionados.

**Tabela 4.5** – Valores das médias dos desvios padrão com o valor das médias de  $C_T$  para cada diluição padrão de ncDNA\*.

Concentração (ng/ $\mu$ L)		Média $C_T$	Desvio Padrão
50	<i>Large</i>	19,4176	0,032
	<i>Small</i>	21,0864	0,243
5	<i>Large</i>	22,7957	0,144
	<i>Small</i>	24,4317	0,246
0,5	<i>Large</i>	26,1253	0,269
	<i>Small</i>	27,6178	0,218
0,05	<i>Large</i>	29,5034	0,487
	<i>Small</i>	31,0111	0,238
0,005	<i>Large</i>	32,6959	0,673
	<i>Small</i>	33,8457	0,442

\*Reações em duplicado realizadas em 3 momentos distintos para cada concentração.



**Figura 4.6** - Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  em função da concentração de ncDNA em ambos os alvos (*large* e *small*) e respetivo erro associado.

Como é possível verificar, os valores observados de  $C_T$  apresentam uma variação inversamente proporcional à concentração das amostras quantificadas. Uma vez que o *kit* possui marcadores para os alvos *large* e *small*, é possível observar, tal como previsto, que a sua



relação também reflete sempre um maior valor de  $C_T$  para o alvo de ncDNA *small*, em cada concentração padrão. Os dados obtidos mantiveram-se semelhantes ao longo dos 3 dias de análises (**Anexo II – Tabela B5**), verificando-se também análogos aos obtidos relativamente a quantificação de mtDNA, com o ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”.

No entanto, verifica-se necessário referir a não obtenção de resultados nas concentrações de DNA padrão de 0,005 ng/ $\mu$ L, correspondentes ao ensaio 2 e relatados no **Anexo II (Tabela B5)**. A sua omissão representa uma falha de amplificação no ensaio e não tendo sido encontrada justificação para esta, a mesma foi atribuída a um possível erro de manuseamento por parte do investigador. Este facto não foi comprovado por falta de amostra de DNA controle para repetição do ensaio, todavia, o mesmo não interferiu na análise dos resultados obtidos.

É de assinalar a variabilidade dos valores apresentados pelos desvios padrão em relação às concentrações padrão, havendo um aumento congruente dos desvios de acordo com a respetiva diminuição das concentrações das amostras padrão. A fundamentação para este acontecimento foi dada previamente, aquando da correlação do mesmo efeito para a quantificação de mtDNA.

Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) das curvas padrão, obtidas para cada um dos alvos de ncDNA quantificados e representativa da média dos valores de  $C_T$ , apresenta-se superior a 0,99, como é possível verificar através da **Figura 4.6**.

Confirma-se, portanto, no estudo efetuado, consistência e estabilidade nos valores de  $C_T$  (mesmo em dias distintos), resultados que atestam a precisão do *kit* relativamente à reprodutibilidade dos mesmos.

No **Anexo II (Tabela B5 e Figura B3)** estão representados, de forma detalhada, os dados obtidos no estudo do parâmetro supra descrito.

#### - Sensibilidade

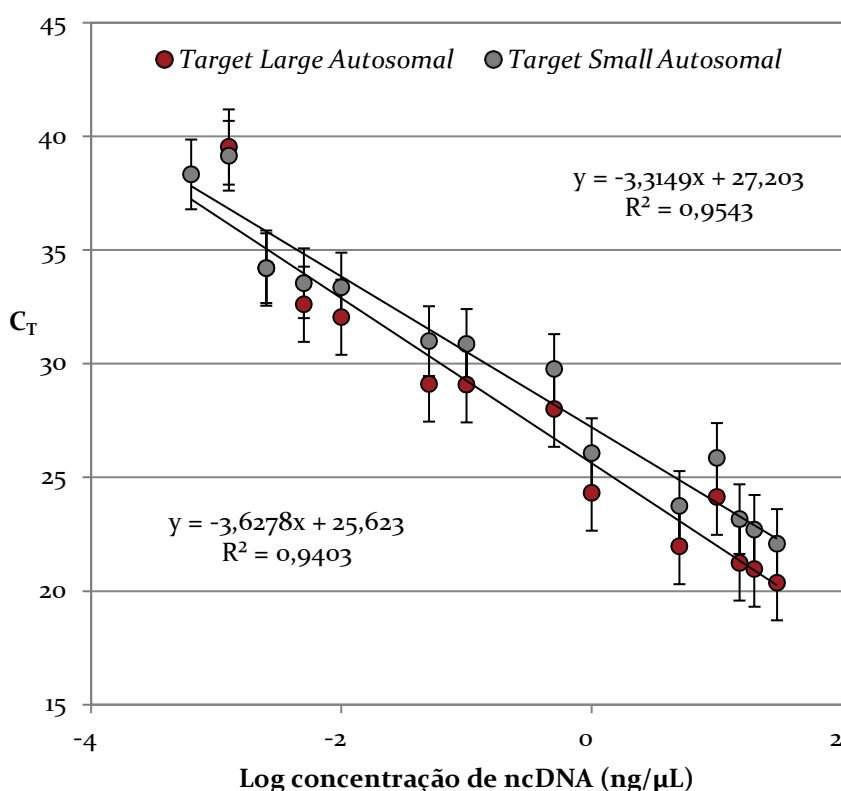
Neste estudo, a partir de uma amostra controlo *DNA K562 (Promega)*, com 10 ng/ $\mu$ L, prepararam-se 14 diluições seriadas. Produziram-se duplicados das diluições feitas para o ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*”, tal como descritas na **Tabela 4.2**, relativamente ao ncDNA. Como objetivo, tentou-se diminuir a concentração mínima de deteção para um valor equivalente a 0,0017 pg/ $\mu$ L (0,000625 ng/ $\mu$ L).

Foram obtidos valores de quantificação para todas as diluições efetuadas e dentro dos parâmetros analisados pelo *kit* e pelo *software*. Verificou-se, como esperado, uma relação de linearidade (em escala logarítmica) entre os valores de  $C_T$  e a concentração de ncDNA. No

**Anexo II – Figura B4**, encontram-se dados representativos, que corroboram os resultados descritos, assim como a **Figura 4.7** que correlaciona a quantidade de ncDNA esperada, com os valores de  $C_T$ .

De acordo com os valores obtidos, nas duas menores concentrações testadas (0,00125 e 0,000625 ng/μL), detetou-se uma certa ambiguidade dos resultados, indicativa de incerteza na análise dos mesmos (**Anexo II – Tabela B6**). Relativamente a esta situação, foi possível a detecção, mas não a quantificação, uma vez que são valores muito baixos e inferiores às condições de detecção testadas pelo fabricante do “Quantifiler® Trio DNA Quantification”.

É também importante salientar, que na detecção ocorrida para o valor mais baixo de concentração testada, a mesma foi relativa apenas ao *target small autosomal*. O resultado está de acordo com o facto de, quanto menor a concentração em análise, menor é quantidade de amostra, havendo uma maior probabilidade de existir degradação da mesma. Assim, o DNA presente, será detetado mais facilmente através da sonda *small autosomal*.



**Figura 4.7** - Correlação da quantidade de ncDNA esperada (em escala logarítmica) vs o  $C_T$ , para o estudo da sensibilidade.

Na **Figura 4.7**, os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) das curvas padrão, obtidos a partir das diluições efetuadas e para cada um dos alvos selecionados, são superiores a 0,94 (**0,95** > 0,94), o que, embora sendo considerado um valor baixo, atesta a legitimidade dos resultados alcançados. Os resultados foram mais precisos para o primeiro teste (Precisão – **Figura 4.6**).

A elevada sensibilidade do *kit* é demonstrada através da deteção e quantificação das amostras com concentrações tão reduzidas como 0,000625 ng/ $\mu$ L, o que pode, contudo, levar a uma má interpretação de resultados aquando da quantificação de quantidades exíguas.

Nestes casos, a confirmação dos resultados deve ser feita aumentando o número de ciclos e analisando a amplificação do IPC. Em caso da obtenção de parâmetros normais de amplificação do IPC, para um máximo de 45/50 ciclos, mas sem que haja deteção de DNA humano, é possível inferir a ausência total de DNA na amostra (*target large autosomal* assim e *target small autosomal*).

Os resultados pormenorizados, relativamente ao estudo do parâmetro sensibilidade, encontram-se descritos em **Anexo II** (**Figura B4**, **Tabela B6** e **Figura B5**).

Conclui-se, após a análise do parâmetro sensibilidade, que os resultados foram de encontro ao esperado, mantendo a tendência linear (em escala logarítmica) em ambos os alvos. É importante salientar que se verifica uma maior tendência linear no que diz respeito ao *target small autosomal*, tal como previsto, de acordo com o tamanho do material detetado. Teria sido, porém, uma mais-valia para o estudo realizado a concretização de pelo menos, um ensaio de confirmação no que diz respeito ao parâmetro da sensibilidade e seria também mais proveitoso para a sensibilidade se a gama de concentrações testadas fosse aumentada.

## 4.2 Impacto da quantificação no DNA humano

### – Recurso às amostras biológicas

Para analisar a utilidade que a quantificação de DNA (tanto nuclear como mitocondrial) possa ter na rotina laboratorial, torna-se essencial testar a sua aplicação em amostras biológicas, semelhantes às processadas nas perícias.

Como referido inicialmente, estudaram-se um total de 63 amostras, entre as quais, 27 de manchas de sangue, 10 de zaragatoas bucais e 25 amostras de cabelo. Quanto às amostras, tanto de manchas de sangue, como de esfregaços bucais, estas poderiam estar degradadas, uma

vez que se encontravam armazenadas há um longo período de tempo, desconhecendo-se o seu estado de conservação. Relativamente aos cabelos, são amostras que apresentam grande taxa de insucesso na obtenção de resultados para fragmentos STR. Na sua maioria, os cabelos obtidos para análise encontram-se em apoptose celular (sem raiz), o que é indicativo da escassez de DNA na amostra. O processo para análise deste tipo de amostra torna-se difícil, moroso e bastante dispendioso.

Como tal, a existência de elevadas concentrações de ncDNA não eram, à partida, expectáveis assim como, o número de cópias de mtDNA.

#### 4.2.1 Quantificação de ncDNA

Na avaliação do resultado da aplicação do kit “Quantifiler® Trio DNA Quantification” (Applied Biosystem) e procedeu-se à quantificação de ncDNA nas amostras biológicas, anteriormente citadas.

Embora as amostras de mancha de sangue e zaragoas bucais, sejam mais utilizadas, a quantificação a partir de amostras de cabelo foi também efetuada, apesar do grau de dificuldade suscitado na análise das mesmas, como previamente destacado.

As amostras foram quantificadas, verificando-se a deteção e amplificação de ncDNA presente em cada uma delas. Duas das amostras de mancha de sangue e uma de zaragatoa bucal, para as quais não se obteve quantificação de ncDNA, devido à presença de inibidores, não foram consideradas para efeitos estatísticos. A **Tabela 4.6**, **Tabela 4.7** e **Tabela 4.8** apresentam a concentração de ncDNA obtida para cada amostra analisada, estando os mesmos valores reunidos por grupo de amostras.

Para as 63 amostras que foram quantificadas, estas apresentaram valores de ncDNA, na sua maioria, baixos. De referir que, o valor da concentração total de ncDNA é adquirido através do valor apresentado pelo *target small autosomal*.

Com as diluições padrão para atestar a viabilidade dos dados, podemos afirmar que, os valores de quantificação se encontravam entre 48,42 ng/μL - 0,0001 ng/μL para ncDNA, à exceção de um valor máximo obtido para uma amostra de cabelo (CB10), em que a concentração obtida foi de 2059600 ng/μL, valor confirmado posteriormente.

**Tabela 4.6** – Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (manchas de sangue).

Concentração de ncDNA (ng/μl) – (N <sub>SG</sub> =27)				
Número da Amostra	<i>Target Large Autossomal</i>	<i>Target Small Autossomal</i>	Índice de degradação	
1	0,9653	0,5416	0,5611	
2	0,003	0,0133	4,4333	
3	0,0528	0,0309	0,5852	
4	0,0433	0,0258	0,5958	
5	0,0014	0,0021	1,5	
6	0,0007	0,0002	0,2857	
7	0,0003	0,0003	1	
8	0,0007	0,0003	0,4286	
9	0,013	0,0178	1,3692	
10	0,0011	0,0029	2,6364	
11	0,0004	0,0003	0,75	
12	0,002	0,0052	2,6	
13	0,0011	0,0005	0,4545	
14	0,0064	0,0068	1,0625	
15	0,0039	0,0027	0,6923	
16	0,0073	0,006	0,8219	
17	0,0025	0,0032	1,28	
18	0,0051	0,0063	1,2353	
19	0,0043	0,0021	0,4884	
20	0,0095	0,0035	0,3684	
21	0,0144	0,0051	0,3542	
22	0,71	0,2919	0,4111	
23	0,5225	0,2575	0,4928	
24	0,4628	0,1772	0,3829	
25	0,3737	0,1614	0,4319	
26	0,3885	0,1474	0,3794	
27	0,7338	0,304	0,4143	

**Tabela 4.7** – Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (zaragatoas bucais).

Concentração de ncDNA (ng/μl) – (N <sub>ZG</sub> =10)				
Número da Amostra	<i>Target Large Autossomal</i>	<i>Target Small Autossomal</i>	Índice de degradação	
1	0,498	0,534	1,0723	
2	1,9815	2,8808	1,4538	
3	1,5024	1,1371	0,7569	
4	0,503	0,211	0,4195	
5	44,7575	48,4259	1,082	
6	2,7664	5,3519	1,9346	
7	0,0084	0,0081	0,9643	
8	0,0044	0,0282	6,4091	
9	0,006	0,0366	6,1	
10	0,0179	0,0637	3,5587	

**Tabela 4.8**– Tabela relativa às concentrações de ncDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (cabelo).

Concentração de ncDNA (ng/μL) – (N <sub>CB</sub> =25)			
Número da Amostra	<i>Target Large Autosomal</i>	<i>Target Small Autosomal</i>	Índice de degradação
1	0,0008	0,0018	2,25
2	0,0003	0,0006	2
3	0,0004	0,0002	0,5
4	0,0001	0,0025	25
5	0,0001	0,0003	3
6	0,0013	0,0025	1,9231
7	0,0007	0,0004	0,5714
8	0,0018	0,0014	0,7778
9	0,0001	0,0003	3
10	0,0002	0,013	65
11	0,002	0,0287	14,35
12	0,015	0,0328	2,1867
13	0	0,0003	-
14	0,0001	0,0004	4
15	0,0023	0,0189	8,2174
16	0,0007	0,0038	5,4286
17	0	0,0003	-
18	0	0,0054	-
19	0	0,0005	-
20	0	0,0013	-
21	0	0,0001	-
22	0,041	0,0349	0,8512
23	0,0003	0,0006	4,6538
24	0	0,0004	-
25	0	0,0027	-

É possível observar, pelas tabelas apresentadas que, as concentrações de ncDNA obtidas para as amostras de zaragatoas bucais foram, em média, superiores às das restantes amostras (valor médio de 0,8098 ng/μL *large* e 1,1390 ng/μL *small*), assim como, as mais baixas foram para amostras de cabelo (valor médio de 0,0028 ng/μL *large* e 0,0059 ng/μL *small*). De ressaltar que, para a análise dos valores médios das concentrações de ncDNA, nas amostras em estudo, foram excluídos dos cálculos as amostras ZG5 e CB10, por forma a não enviesar os resultados. O valor destas duas amostras foram considerados demasiado elevados em comparação com os valores das restantes amostras e como tal, estão fora do intervalo considerado admissível.

Como expetável, os valores das concentrações de ncDNA apresentam-se, no geral, superiores para o *target small autosomal* em relação ao *target large autosomal*, explicação dada através da proporção da degradação exibida pelas amostras e esclarecida em seguida.

#### - Índice de degradação

O kit “Quantifiler® Trio DNA Quantification” (Applied Biosystem) tem a vantagem de permitir a avaliação, em simultâneo, não só a quantidade, mas também o índice de degradação de ncDNA existente nas amostras.

É dada a designação de Índice de degradação (ID) à razão entre a concentração do *target small autossomal* e a concentração do *target large autossomal*. Esta razão permite avaliar o estado de degradação apresentado pelas amostras. Como descrito no manual do referido kit, o *target large autossomal*, devido a ser um alvo maior, se a amostra apresentar degradação, este será detetado em menor quantidade. Assim, a razão entre as duas concentrações (ID), reflete o estado de degradação da amostra.

Os resultados obtidos mostram que o ID para amostras de cabelo varia entre 25 – 0,5, sendo a maioria dos valores superiores a 2, havendo amostras em que o cálculo não foi possível de realizar devido à inexistência de deteção do *target large autossomal*. Para as amostras de mancha de sangue o ID varia entre 4,43 – 0,29 e para as amostras de zaragatoas bucais entre 6,41 – 0,42 (Tabela 4.6, Tabela 4.7 e Tabela 4.8).

Pormenores relativos ao estudo da quantificação de ncDNA, com recurso às amostras biológicas, encontram-se descritos em **Anexo II (Tabela B7)**.

#### 4.2.2 Quantificação de mtDNA

As amostras biológicas supra mencionadas, foram também utilizadas para se proceder à quantificação do mtDNA utilizando o ensaio “TaqMan® Universal PCR Master Mix”.

Tal como definido na análise anterior, em relação às amostras em estudo, mantiveram-se as mesmas considerações para a quantificação de mtDNA. De realçar que, dada a existência de um maior número de cópias e da sua maior resistência a uma possível degradação, era exetável que, a quantidade de mtDNA por célula, por amostra, fosse superior à quantidade de ncDNA, em qualquer uma das amostras em análise (degradadas ou não).

Na Tabela 4.9, Tabela 4.10 e Tabela 4.11 estão representadas as concentrações de mtDNA obtidas para cada uma das amostras analisadas, agrupando-se os valores por tipo, como realizado anteriormente.

Nas 62 amostras, os valores da quantificação de mtDNA apresentaram-se com concentrações bastante reduzidas em que, o valor mais elevado foi de 12,59 pg/μL. O valor mais baixo encontrado para a concentração foi de 0,0001 pg/μL, em amostras de zaragatoas bucais e de cabelos.

**Tabela 4.9** – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (manchas de sangue).

Concentração de mtDNA (ng/μl) – (N <sub>SG</sub> =27)		
Número da Amostra		<i>mtDNA</i>
1		1,964
2		0,2593
3		0,0152
4		0,0164
5		0,0003
6		0,0001
7		0,0001
8		0,0001
9		0,0002
10		0,0004
11		0,0003
12		0,0015
13		0,0004
14		0,0006
15		0,0023
16		0,0029
17		0,0003
18		0,001
19		0,0041
20		0,0145
21		0,0178
22		0,0693
23		0,0679
24		0,082
25		0,0515
26		0,049
27		0,0204

**Tabela 4.10** – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (zaragatoas bucais).

Concentração de mtDNA (ng/μl) – (N <sub>ZG</sub> =10)		
Número da Amostra		<i>mtDNA</i>
1		0,0237
2		0,11
3		0,1167
4		0,0674
5		0,2593
6		0,0012
7		0,0016
8		0,0001
9		0,0002
10		0,0012



**Tabela 4.11** – Tabela relativa às concentrações de mtDNA (ng/μL) presentes em cada amostra testada (cabelo).

**Concentração de mtDNA (ng/μl) – (N<sub>CB</sub>=25)**

Número da Amostra	mtDNA
1	0,0026
2	0,0035
3	0,0019
4	0,0053
5	0,002
6	0,0128
7	0,003
8	0,0158
9	0,0038
10	0,0164
11	0,0369
12	0,0265
13	0,0167
14	0,0047
15	0,0085
16	0,0033
17	0,0027
18	0,0098
19	0,0039
20	0,0013
21	0,0034
22	0,0367
23	0,0009
24	0,1216
25	0,0018

A reprodutibilidade deste estudo ficou assegurada uma vez que os resultados do coeficiente de correlação foram superiores a 0,9 (**Tabela 4.12**).

**Tabela 4.12** - Valores relativos aos coeficientes de correlação ( $R^2$ ), obtidos para os 8 ensaios distintos, na quantificação de mtDNA em 3 tipos amostras diferentes.

Ensaio	Coeficiente de Correlação	Ensaio	Coeficiente de Correlação
1	0.995	5	0.996
2	0.998	6	0.999
3	0.998	7	0.994
4	0.999	8	0.999

### 4.3 Aplicações da quantificação de DNA humano

Um dos objetivos deste estudo é a aplicação dos resultados da quantificação na obtenção de perfis genéticos, quer através da análise de fragmentos STR, quer de miniSTR.

Verificou-se também o interesse da sequenciação de mtDNA e esta foi realizada para os segmentos HVI e HVII.

A sequenciação de mtDNA não substitui a análise de fragmentos STR, poderá no entanto, proporcionar resultados, em casos, nos quais é impossível o estudo destes marcadores.

Após a avaliação simultaneamente da quantidade e da qualidade de uma dada amostra, foi possível prever qual o impacto do grau de degradação da mesma para a obtenção do respetivo perfil genético. Como referido anteriormente, os resultados do *target small autosomal* são indicativos da concentração de ncDNA, enquanto os resultados do *target large autosomal* auxiliam na determinação do nível de degradação, através do respetivo ID.

A partir da observação do ID é possível decidir, de uma forma mais exata, qual o tipo de *kit* a usar para a análise de fragmentos ou se, por outro lado, se verifica mais eficiente realizar a sequenciação de mtDNA.

#### 4.3.1 Análise de fragmentos STR

Com base nos dados após a quantificação, a análise de STR foi realizada em apenas 11 amostras de mancha de sangue e 5 amostras de zaragatoa bucal. As restantes amostras apresentaram quantidades muito baixas (entre 0,0002 ng/ $\mu$ L e 0,0021 ng/ $\mu$ L) e/ou a presença de índices de degradação elevados (entre 4,43 e 6,4).

Nas amostras de cabelo, apenas 4 das mesmas foram selecionadas para análise de fragmentos STR. A análise de fragmentos não foi realizada nas restantes amostras de cabelo devido também, às baixas concentrações de DNA obtidas (0,0001 ng/ $\mu$ L - 0,0038 ng/ $\mu$ L) e/ou índices de degradação (ID's) bastante elevados (entre 14,35 e 25).

Dos 5 *kit's* testados foram selecionados apenas 3 de acordo com a viabilidade dos resultados obtidos (**Tabela 4.13**).

**Tabela 4.13** – *Kit's comerciais testados na amplificação de DNA.*

<i><b>Kit's Comerciais</b></i>	<i><b>Fabricante</b></i>
<i>PowerPlex® ESI 17 Pro System</i>	<i>Promega</i>
<i>AmpFLSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit</i>	<i>Applied Biosystems</i>
<i>GlobalFiler™ PCR Amplification Kit</i>	<i>Applied Biosystems</i>
<i>PowerPlex® Fusion Systems</i>	<i>Promega</i>
<i>AmpFLSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit</i>	<i>Applied Biosystems</i>

\*

\*Assinalados os 3 Kit's selecionados

É necessário referir que, nos *kit's* “*AmpFLSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit*” e “*PowerPlex® Fusion Systems*” o volume total de reação foi reduzido para metade do aconselhado pelo fabricante.

Para os restantes *kit's* comerciais o volume total de reação foi de 25µL, o que corresponde uma concentração de DNA ótima de 0,5 a 1 ng.

O *kit* “*AmpFLSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit*” foi utilizado uma vez que amplifica só mini-STR.

Obteve-se um perfil completo em 2 amostras de mancha de sangue e numa amostra de zaragatoa bucal (**Tabela 4.14**). Para as restantes 9 amostras de mancha de sangue e 4 de zaragatoas bucais, observou-se um perfil incompleto.

Foi obtido também um perfil completo para uma amostra de cabelo (**Tabela 4.14**), sendo observado para as restantes 3 amostras um perfil incompleto.

**Tabela 4.14** - Perfis genéticos obtidos para as amostras em análise e controlo *DNA K562* (3 *kit's* comerciais distintos).

	Controlo	Amostras				
	K562	SG3	SG4	ZB4	CB22	
		Mancha de Sangue		Zaragatoa Bucal	Cabelo	
D3S1358	16	14, 16	14, 16	17	15, 16	
vWA	16	16, 17	16, 18	14, 17	14, 15	
D16S539	11, 12	11, 12	8, 11	11, 14	11, 12	
CSF1PO	9, 10	11, 12	12, 13	10, 11	10, 11	
TPOX	8, 9	8, 9	10, 11	8	8	
Amelogenin	X	X	X	X	X	
D8S1179	12	12	15	13, 14	12, 14	
D21S11	29, 30, 31	29, 31	30, 33.2	28, 29	27, 31	
D18S51	15, 16	10, 20	12, 17	14, 21	15, 16	
D2S441	10, 14	12, 13	11, 13	10, 14	10, 14	
D19S433	14, 14.2	13, 14	14	15	14, 14.2	
TH01	9.3	7, 9.3	6, 9	6, 9.3	9, 9.3	
FGA	21, 24	20, 22	20, 24	20, 27	21, 22	
D22S1045	16	15, 17	15	16	15, 16	
D5S818	11, 12	11, 12	11	11, 12	11, 12	
D13S317	8	12, 14	8, 11	11, 12	8	
D7S820	9, 11	11, 12	10, 11	10, 11	9, 10	
D10S1248	12	13, 14	13, 15	11, 12	13, 14	
D1S1656	15, 16	11, 14	15, 18.3	12, 13	17, 17.3	
D12S391	23	17, 18	18, 20	18, 19	20.3, 23	
D2S1338	17	15, 17	19, 25	17, 25	17, 19	
DYS391	-	-	-	-	-	
GlobalFiler®	Y indel	-	-	-	-	
	SE33	26.2, 28.2	17, 24.2	20.2, 30.2	24, 24.2	19, 37
PowerPlexFusion®	Penta E	5, 14	7, 12	10, 12	7, 12	-
	Penta D	9, 13	10, 14	10, 12	10	12

A análise de fragmentos STR foi também efetuada para o controlo *DNA K562* (*Promega*) (**Tabela 4.14**). A análise foi realizada nas várias concentrações testadas, tendo-se obtido o perfil completo para as concentrações de 0,1ng/μL, 0,5ng/μL, 1ng/μL e 5ng/μL (**Tabela 4.15**). Como esperado, as concentrações acima de 15 ng/μL apresentam perfis fracos/incompletos devido ao excesso de DNA. Nas concentrações inferiores, de 0,01 ng/μL verificaram-se também resultados bastante fracos ou nulos.

**Tabela 4.15** – Amostras selecionadas para análise de fragmentos e onde foi possível visualizar um perfil completo.

**Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit (ncDNA)**

Amostra	ng/ $\mu$ L	Ct
<i>Controle K562</i>		
<b>5ng/<math>\mu</math>L</b>	64,008	23,7445
<b>1ng/<math>\mu</math>L</b>	1,303	26,0657
<b>0,5ng/<math>\mu</math>L</b>	0,1031	29,7656
<b>0,1ng/<math>\mu</math>L</b>	0,0484	30,8682
<b>0,05ng/<math>\mu</math>L</b>	0,0443	30,9957
<i>Mancha de Sangue</i>		
<b>SG3</b>	0,0309	31,8449
<b>SG4</b>	0,0258	32,1018
<i>Zaragatoa Bucal</i>		
<b>ZG4</b>	0,211	29,1334
<i>Cabelo</i>		
<b>CB22</b>	0,0349	31,3447

#### 4.3.2 Sequenciação de mtDNA

A análise de mtDNA foi efetuada no controlo *DNA K562 (Promega)*. Em todas as concentrações testadas, foi possível obter uma sequência completa, para ambos os segmentos HVI e HVII.

Os dados da quantificação de mtDNA através do ensaio “*TaqMan® Universal PCR Master Mix*” sugerem que, concentrações acima de 15 ng/ $\mu$ L de DNA<sub>Total</sub> podem inibir a amplificação devido ao excesso de DNA. As concentrações de DNA até 0,0025ng/ $\mu$ L não foram limitantes para a PCR. O conhecimento prévio de uma quantidade apropriada de amostra para utilizar na reação de PCR é uma ferramenta importante para impedir o desperdício da amostra em futuras análises, que se verifiquem necessárias.

## V - CONCLUSÕES

---

## V - CONCLUSÕES

A partir do estudo relativo à quantificação e posterior análise do material genético, tanto de ncDNA como de mtDNA, foi possível concluir o seguinte:

- A regressão linear das curvas padrão, obtidas no decorrer de cada ensaio realizado, demonstrou uma elevada reprodutibilidade, precisão e sensibilidade. Estes resultados são válidos quer para a quantificação de ncDNA, para a quantificação de mtDNA, encontrando-se esta última de acordo com os dados de *Niederstatter et al.* [2]. Nas diluições do controlo DNA K562 (*Promega*), e de acordo com as expectativas, a concentração de 0,00125ng apresentou maior grau de variação em cada quantificação (ncDNA e mtDNA) relativamente aos testes de sensibilidade e precisão.
- As concentrações acima de 5 ng/μl apresentaram perfis com fraca qualidade devido ao excesso de DNA. Para concentrações menores, com valores a partir de 0,05ng/μl obtiveram-se também resultados incompletos ou nulos.
- Os dados da quantificação de mtDNA por ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” sugerem que, concentrações acima de 15 ng/μL de DNA<sub>Total</sub> podem inibir a amplificação devido ao excesso de DNA. A concentração de 0,0025 ng/μl não foi limitante para a PCR (mtDNA), deste modo, concentrações mais baixas poderão ser testadas.

A quantificação de DNA (nuclear e mitocondrial) revela-se uma ferramenta importante, uma vez que possibilita ao perito decidir qual o tipo de análise de DNA a realizar numa amostra, sem que ocorra perda da mesma.

Os resultados confirmaram que o “*Quantifiler®Trio DNA Quantification Kit*” é um método robusto e preciso para a quantificação de ncDNA. O índice de degradação também incluído neste *kit* permite-nos, de certa forma, prever se uma análise de fragmentos STR é viável ou não.

A quantificação de mtDNA usando o ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” revelou-se útil para prever a quantidade de mtDNA, sendo contudo uma metodologia mais exhaustiva e ainda bastante dispendiosa.

A limitação de material e tempo para a realização dos ensaios apresentaram-se como os factores limitantes mais desfavoráveis para a obtenção de resultados mais precisos, assim como para a validação dos mesmos.

Após este estudo, conclui-se que, futuramente, o mesmo possa ser aprofundado, permitindo a utilização da PCR em tempo-real de forma mais eficiente.



## **VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Pinheiro MF. **A Perícia em Genética e Biologia Forense – Criminalística Biológica in CSI**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2008.
- [2] Machado H, Silva S, Amorim A. **Políticas de identidade: perfil de DNA e a identidade genético-criminal**. *Análise Social*. 2010; vol. 196: 537-553.
- [3] Taupin JM. **Introduction to Forensic DNA Evidence for Criminal Justice Professionals**. USA: Edições CRC Press; 2013.
- [4] Bonaccorso NS. **Aplicação do Exame de DNA na Elucidação de Crimes**. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
- [5] Lei nº5/2008. Diário da Republica 1ªsérie, Nº30, de 12 de Fevereiro de 2008.
- [6] Butler JM. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers** USA: Edições Academic Press; 2005.
- [7] Pinheiro MF **Genética Forense: Perspectivas da Identificação Genética**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2010.
- [8] Oliveira AR. **Quantificação de ADN nuclear e de ADN Mitocondrial por PCR em Tempo Real**. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2009.
- [9] Despacho nº 2584/2006 de 19 de Janeiro de 2006.
- [10] Butler JM, Yin Shen, Bruce RM. **The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA**. *J Forensic Sci*, 2003; vol. 48(5): 1054-1064.
- [11] Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, *et al*. **High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR**. *Current Protocols in Molecular Biology*. *Curr Protoc Mol Biol*. 2006; vol. 15: 15.8.

- [12] Zajac P, Oberg C, Ahmadian A. **Analysis of Short tandem repeats by parallel DNA threading.** *PLoS One*. 2009; vol. 13;4 (11): e7823.
- [13] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) **Short tandem repeat (STR) interpretation guidelines.** *Forensic Sci Comm*. 2000; vol. 2(3).
- [14] Argueta NB, De la Cruz BM, Mejorado RC, *et al.* **Forensic-paternity effectiveness and genetics population analysis of six non-CODIS mini-STR loci (D1S1656, D2S441, D6S1043, D10S1248, D12S391, D22S1045) and SE33 in Mestizo and Amerindian populations from Mexico.** *Ann. Hum. Biol.* 2015; vol. 9: 1-9.
- [15] Martín P, García O, Albarrán C, *et al.* **Application of mini-STR loci to severely degraded casework samples.** *Int Congress Series*. 2006; vol. 1288: 522 – 525.
- [16] Sobrino B, Brion M, Carracedo A. **SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies.** *J Forensic Sci Int*. 2005; vol. 154(2-3): 181-194.
- [17] Anderson S, Bankier AT, Bruce BG, *et al.* **Sequence and organization of the mitochondrial human genome.** *Nature*. 1981; vol. 290: 457-465.
- [18] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, *et al.* **Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.** *Nat Genet*. 1999; vol. 23(2): 147.
- [19] Gunn A. **Essential Forensic Biology**. UK: Edições Wiley – Blackwell; 2009.
- [20] Pelt – Verkuill E, Belkum A, Hays JP. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification** Berlím: Edições Springer Science; 2008.
- [21] Budowle B, Allard MW, Wilson MR, *et al.* **Forensic and Mitochondrial DNA - Applications, Debates, and Foundations.** *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003; vol. 4: 119-141.
- [22] Andreasson H, Nilsson M, Budowle B, *et al.* **Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials.** *Forensic Sci Int*, 2006; vol. 164(1): 56-64.

- [23] Brandstätter A., Peterson CT, Irwin JA, *et al.* **Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database.** *Int J Legal Med.*, 2004; vol. 118(5):294-306.
- [24] Bandelt HJ, Kivisild T. **Quality assessment of DNA sequence data: autopsy of a mis-sequenced mtDNA population sample.** *Ann Hum Genet.* 2006; vol. 70(3):314-26.
- [26] Jaiprakash GS, Ray HL, **Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies.** USA: Edições CRC Press; 2013.
- [27] Consortium IHGS. **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature.* 2004; vol. 431(7011): 931-945.
- [28] Holland MM, Parsons TJ. **Mitochondrial DNA Sequence Analysis -Validation and Use for Forensic Casework.** *Forensic Sci Rev.* 1999; vol 11(1):21-50.
- [29] Carracedo A, Bär W, Licoln P, *et al.* **DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing.** *Forensic Sci Int.* 2000; vol. 110(2), 79-85.
- [30] Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, *et al.* **Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians.** *J Forensic Sci.* 1999; vol. 44(6):1277-1286.
- [31] Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, *et al.* **Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis.** *PLoS One.* 2009; vol. 4(3):e4838.
- [32] Bonengel SL, Sanger T, Pollak S, *et al.* **Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region.** *Int J Legal Med.* 2004; vol. 118 (274-281).
- [33] Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, *et al.* **Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians.** *Int J Legal Med.* 2004; vol. 118: 137-146.

- [34] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, *et al.* **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)*. 1993; vol. 11 (9):1026-30.
- [35] Dorak MT. **Real-Time PCR**. UK: Edições Taylor & Francis Group; 2006.
- [36] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, *et al.* **Real time quantitative PCR.** *Genome Res.* 1996; vol. 6 (10):986-94.
- [37] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, *et al.* **The real-time polymerase chain reaction.** *Mol Aspects Med.* 2006; vol 27(2-3): 95-125.
- [38] Alonso A, Martínez P, Albarrana C, *et al.* **Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies.** *Forensic Sci Int.* 2004; vol. 139: 141-149.
- [39] Niederstätter H, Köchl S, Grubwieser P, *et al.* **A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA.** *Forensic Sci Int Genet.* 2007; vol. 1(1):29-34.
- [40] Silva MF, Ramos J, Pelerito A, *et al.* **O Potencial da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*.** *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde.* 2007; vol. (4) 1: 89-99.
- [41] Rapley R, Alonso A, Fernández O. **Real-time quantitative PCR in forensic science - Molecular Forensics.** UK: Edições John Wiley & Sons, Ltd; 2003.
- [42] Holland PM, Abramson RD, Watson R, *et al.* **Biochemistry Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus).** *Pro. Natl Acad Sci.* 1991; vol. 88:7276-7280.
- [43] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, *et al.* **Real time quantitative PCR.** *Genome Res.* 1996; vol. 6(10): 986-94.

- [44] Erali M, Wittwer CT. **High resolution melting analysis for gene scanning.** *Elsevier Inc.* 2010; vol. 50(4):250–61.
- [45] Tobe SS, Linacre AMT. **A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures.** *Forensic Sci Int Gene.* 2008; vol. 2: 249–256.
- [46] Advisory Bord. **Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories.** *Forensic Sci Comm.* 2010; vol. 2 (3).
- [47] Nicklas JA, Buel E. **Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples.** *J Forensic Sci.* 2003; vol. 48(5): 936-44.
- [48] Bravo JR. I. **O aprofundamento da cooperação transnacional em matéria de intercâmbio de prova genética II. A ordem de recolha de amostras em condenados, para análise e inserção na Base de Dados de Perfis de ADN. Conselho de Fiscalização da Base de Dados de Perfis de ADN.** Coimbra : Encontro de Trabalho (BYNUM);2014.
- [49] Walshr MDA, Higuchi R. **Chelex 100 as a médium for simples extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.** *Biotechniques* 1991; vol. 10: 506-513.
- [50] TECHNICAL BULLETIN. **Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™).** **Instructions for Use of Product(s).** USA: Promega Corporation; 2002–2015.
- [51] USER GUIDE. **Quantifiler® HP and Trio DNA Quantification Kits.** USA: Thermo Fisher Scientific, Inc; 2015.
- [52] USER GUIDE. **AmpFISTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit.** USA: Thermo Fisher Scientific, Inc; 2015.
- [53] TECHNICAL MANUAL. **PowerPlex® ESI 17 Pro System. Instructions for Use of Product(s).** USA: Promega Corporation; 2011–2016.
- [54] TECHNICAL MANUAL. **PowerPlex® Fusion System Instructions for Use of Products.** USA: Promega Corporation; 2012–2016.

[55] USER GUIDE. **GlobalFiler™ PCR Amplification Kit**. USA: Thermo Fisher Scientific, Inc; 2016.

[56] USER GUIDE. **AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit**. USA: Thermo Fisher Scientific, Inc; 2012.

## **ANEXO I – Protocolos Laboratoriais**

---



**Protocolo A1** - Método de Quantificação de DNA com TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems) descrito por *Alonso et al.* (2004)

- Deixar descongelar as alíquotas e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
- Descontaminar tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.

1. Preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de quantificação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte:

<i>TaqMan Master Mix</i>	12,5 µL
<i>Primer Mix</i> (100 nM)	2,5 µL
Sonda - mt287 MGB (200 nM)	2 µL
H <sub>2</sub> O (up)	8 µL

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

**Nota:** Reação de amplificação efetuada num volume final de 25 µL.

2. Distribuir numa placa *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plata* (Applied Biosystems) **23 µL** da *mix* preparada anteriormente em cada um dos poços de quantificação;
3. Adicionar a cada poço de quantificação **2 µL** de amostra de DNA;
4. Tapar a placa com uma banda *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
5. Quantificar no “7500 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems), usando as condições de seguintes:

95 °C	10 min	40x
95 °C	15 seg	
60 °C	1 min	
4 °C	∞	

**Nota:** As quantificações foram sempre acompanhadas das Diluições Padrão – *K562 (Promega)* - para a Curva de Calibração e de um controlo negativo –  $H_2O$ .

**Protocolo A2** - Método de Quantificação de DNA com TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems) descrito por *Niederstätter et al.* (2007).

- Deixar descongelar as alíquotas e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
- Descontaminar tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.

1. Preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de quantificação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte:

Separado		Simultâneo	
<i>TaqMan Master Mix</i>	12,5 µL	<i>TaqMan Master Mix</i>	12,5 µL
<i>Primer Mix</i> (100 nM)	2,5 µL	<i>Primer Mix A</i> (100 nM)	2,5 µL
Sonda (200 nM)	2 µL	<i>Primer Mix B</i> (100 nM)	2,5 µL
H <sub>2</sub> O (up)	8 µL	Sonda 1 (200 nM)	2 µL
		Sonda 2 (200 nM)	2 µL
		H <sub>2</sub> O (up)	1,5 µL

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

**Nota:** Reação de amplificação efetuada num volume final de 25 µL.

2. Distribuir numa placa *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plata* (Applied Biosystems) **23 µL** da *mix* preparada anteriormente em cada um dos poços de quantificação;
3. Adicionar a cada poço de quantificação **2 µL** de amostra de DNA;
4. Tapar a placa com uma banda *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
5. Quantificar no “7500 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems), usando as condições de seguintes:

95 °C	10 min	40x
95 °C	15 seg	
60 °C	1 min	
4 °C	∞	

**Nota:** As quantificações foram sempre acompanhadas das Diluições Padrão – *K562 (Promega)* - para a Curva de Calibração e de um controlo negativo – H<sub>2</sub>O.

**Protocolo A3 - Método de Amplificação de DNA com AmpFlSTR® NGM Select™ (Applied Biosystems)**

- Vortexar reagentes fornecidos;
- Descontaminar os tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.

1. Preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de amplificação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte de acordo com o *kit* comercial:

NGM Select	
<i>Reaction mix</i>	5 µl
<i>Primer set</i>	2,5 µl
<i>DNA</i>	5 µl
<i>V<sub>f</sub></i>	12,5 µl

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

2. Distribuir 7,5 µL da *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;
3. Adicionar a cada poço de amplificação 5 µL de amostra de DNA e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
4. Amplificar no termociclador “GeneAmp® PCR System 9700” (Applied Biosystems), usando uma das seguintes condições, dependendo do *kit* comercial:

95 °C	11 min	30x
94 °C	20 seg	
59 °C	3 min	
60 °C	10 min	

**Nota:** As ampliações foram acompanhadas de um controlo positivo – 007 (*Applied Biosystems*) - e de um controlo negativo – H<sub>2</sub>O.

#### Protocolo A4 – Método de Amplificação de DNA com PowerPlex® Fusion System (Promega)

- Vortexar reagentes fornecidos;
- Descontaminar tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.

1. Preparar num *eppendorf* de 1,5 mL a *mix* de quantificação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte:

Fusion	
<i>PowerPlex® Fusion 5X Master Mix</i>	2,5 µL
<i>PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix</i>	2,5 µL
DNA	2,5/5 µL
H <sub>2</sub> O	Até perfazer o volume final

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

**Nota:** Reação de amplificação efetuada num volume final de 12,5 µL.

2. Distribuir ***mix*** preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;
3. Adicionar a cada poço de quantificação 2,5 µL a 5 µL de amostra de DNA e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
4. Amplificar no termociclador “*GeneAmp® PCR System 9700*” (*Applied Biosystems*), usando uma das seguintes condições, dependendo do *kit* comercial:

96 °C	1 min	30x
94 °C	10 seg	
59 °C	1 min	
72 °C	30 seg	
60 °C	10 min	
4 °C	∞	

**Nota:** As amplificações foram acompanhadas de um controlo positivo – 9974A (*Applied Biosystems*) - e de um controlo negativo – H<sub>2</sub>O.



**Protocolo A5 - Método de Análise de Fragmentos STR, para os kit's comerciais da Applied Biosystems**

1. Após a amplificação do DNA, preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de eletroforese capilar de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte de acordo com o *kit* comercial:

NGM Select		GlobalFiler		Minifiler	
<i>HiDi</i>	12,5 µL	<i>HiDi</i>	12 µL	<i>HiDi</i>	12,5 µL
<i>600 Liz</i>	0,5 µL	<i>600 Liz</i>	1 µL	<i>500 ou 600 Liz</i>	0,5 µL

**Nota:** A reação efetuada num volume final de **14 µL/tubo** para os três *kit's* comerciais.

2. Distribuir **13 µL** da *mix* preparada anteriormente em cada um dos poços;
3. Adicionar a cada poço **1 µL** de produto amplificado e tapar a placa de sequenciação;
4. Desnaturar a placa num termociclador durante 3 minutos a 95 °C, com posterior diminuição de temperatura para 4 °C.
5. Colocar a placa no aparelho “3500 Genetic Analyser® PCR System” (Applied Biosystems) e dar início à eletroforese seguindo as condições descritas para *kit* comercial.

**Nota:** A análise de fragmentos é acompanhada de um ISS – “Internal Size Standard”, fornecido com o *kit* comercial correspondente (Applied Biosystems) e que é inserido conjuntamente com o produto amplificado, em cada poço da placa de sequenciação utilizada. Para além do ISS, cada *kit* contem também um “Allelic Ladder” que é processado de forma semelhante às amostras e que tem como função permitir a atribuição alélica dos diferentes *loci*.

## Protocolo A6 - Método Análise de Fragmentos STR, para os kit's comerciais da Promega

1. Após a amplificação do DNA, preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de eletroforese capilar de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte de acordo com o *kit* comercial:

Fusion		ESI 17 Pro	
HiDi	10 µL	HiDi	12,5 µL
CC5ILS		CC5ILS	
500	1 µL	500	0,5 µL

**Nota:** A reação é efetuada num volume final de **14 µL/tubo** para o *kit* comercial *ESI 17 Pro* e de **12 µL/tubo** para o *kit* comercial *Fusion*.

2. Distribuir **13 µL** da *mix ESI 17 Pro* e **11 µL** da *mix Fusion*, preparada anteriormente, em cada um dos poços, de acordo com o *kit* a utilizar;
3. Adicionar a cada poço **1 µL** de amplificado e selar a placa de reação;
4. Desnaturar a placa de reação num termociclador durante 3 minutos a 95 °C.
5. Colocar a placa no aparelho “3500 Genetic Analyser® PCR System” (Applied Biosystems) e dar início à eletroforese capilar de acordo com as condições fornecidas pelo fabricante.

**Nota:** A análise de fragmentos é acompanhada de um ISS – “Internal Size Standard”, fornecido com o *kit* comercial correspondente (Promega) e que é inserido conjuntamente com o produto amplificado, em cada poço da placa de sequenciação utilizada. Para além do ISS, cada *kit* contem também um “Allelic Ladder” que é processado de forma semelhante às amostras e que tem como função permitir a atribuição alélica dos diferentes *loci*.

### Protocolo A7 - Amplificação por PCR de segmentos hipervariáveis do mtDNA

- Descongelar e vortexar reagentes fornecidos;
- Descontaminar tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.
- A amplificação é realizada em separado para cada uma das regiões hipervariáveis

5. Preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de amplificação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente para a reação é o seguinte:

<i>Master mix (kit TaqPlus (Qiagen))</i>	10 µL
<i>Primer F</i>	0,5 µL
<i>Primer R</i>	0,5 µL
DNA	1 µL
H <sub>2</sub> O (up)	8 µL
<i>Vf</i>	20 µL

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

**Nota:** Os *primers* utilizados encontram-se numa concentração de 10 µM e a tabela seguinte descreve-os, de acordo com a região hipervariável a amplificar.

<b>Região</b>	<b>HVI</b>	<b>HVII</b>
<i>P. Forward</i>	F15989	F16533
<i>P. Reverse</i>	R16433	R460

2. Distribuir **19 µL** de *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;
3. Adicionar a cada poço de amplificação **1 µL** de amostra de DNA;
4. Amplificar no termociclador “GeneAmp® PCR System 9700” (Applied Biosystems), com as seguintes condições:

95 °C	15 min	40x
94 °C	45 seg	
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

5. Previamente à electroforese capilar com *QiAexcel*, realiza-se a purificação do mtDNA através do **Tratamento com ExoSAP-IT**. Adicionar **5 µL** do reagente a cada amostra;
6. Voltar a colocar no termociclador “*GeneAmp® PCR System 9700*” (*Applied Biosystems*), mas com as seguintes condições:

37 °C	40 min
80 °C	20 min
4 °C	∞

### Protocolo A8 – Sequenciação direta de segmentos hipervariáveis de mtDNA

- Descontaminar os tubos durante 15-20 min em Câmara de Ultravioleta.
- A sequenciação é realizada em separado para cada uma das regiões hipervariáveis e para cada cadeia.

1. Preparar num tubo de 1,5 mL a *mix* de sequenciação de acordo com o número de amostras. O volume de cada componente encontra-se registado na tabela a seguir, de acordo com o kit *BigDye v3.1* (*Applied Biosystems*):

<i>Master mix</i>	1,5 µL
<i>Primer F ou Primer R</i>	1 µL
<i>DNA</i>	1 µL
<i>H<sub>2</sub>O (up)</i>	6,5 µL

Vortexar durante 3 seg. a alta velocidade;

**Nota:** Os *primers* utilizados encontram-se numa concentração de 3,2 µM e a tabela seguinte descreve-os, de acordo com a região hipervariável a amplificar.

<b>Região</b>	<b>HVI</b>	<b>HVII</b>
<i>P. Forward</i>	F15989	F16533
<i>P. Reverse</i>	R16433	R460

**Nota:** A reação de sequenciação é efetuada num volume final de **10 µL**.

7. Distribuir **9 µL** de *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de sequenciação;
8. Adicionar a cada poço de sequenciação **1 µL** de amostra de **DNA** e vortexar durante 2 seg. a alta velocidade;
9. Colocar amostras no termociclador “*GeneAmp® PCR System 9700*” (*Applied Biosystems*), com as seguintes condições:

96 °C	10 min	3 x 25
95 °C	5 seg	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

**Nota:** Para a realização da limpeza dos terminadores, utiliza-se o *BigDye X – Terminator* com 45 µL de SAM e 10 µL de X-terminator sol.

10. A preparação da placa para o sequenciador é feita com a adição de 10 µL de amostra e 6 µL de HiDi (formamida) e colocada no aparelho “3130xl Genetic Analyzer”

## **ANEXO II – Informação Suplementar**

---

## Anexo 3.1 - Eficácia da Quantificação de DNA

**Anexo 3.1.1** - Quantificação de mtDNA através do procedimento de ensaio “*TaqMan®Universal PCR Master Mix*” por PCR em Tempo-Real.

### - Precisão

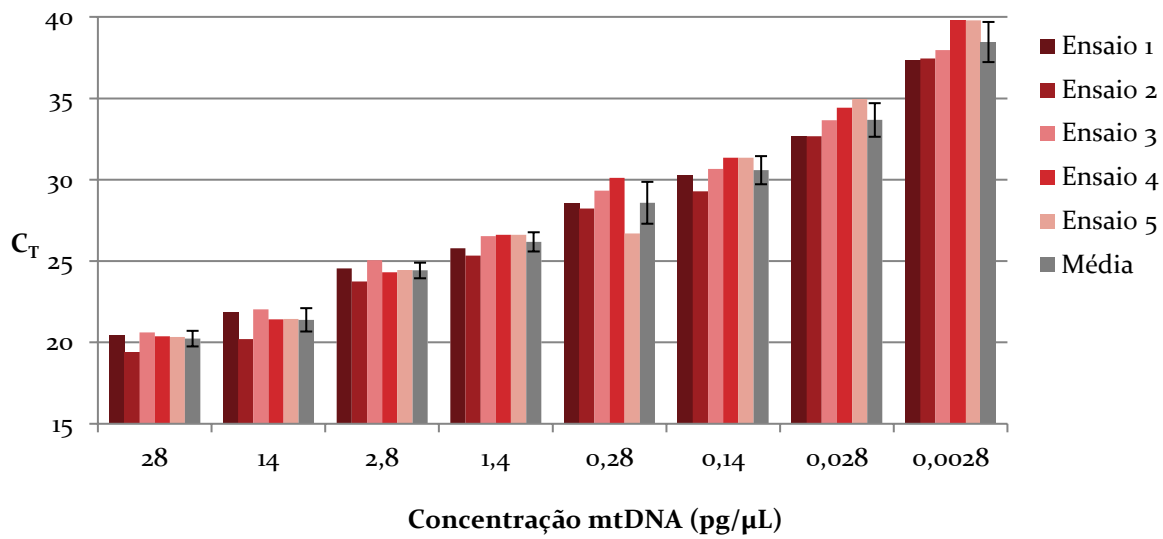
**Tabela B1** - Tabela de valores de  $C_T$ , em função da concentração de mtDNA padrão, em duplicado, obtidos nos 5 ensaios.

Concentração de mtDNA (pg/ $\mu$ L)	Ensaio	1	2	3	4	5	Médias	Desvio Padrão
28	1 <sup>o</sup> Análise	20,6	19,4	-	20,5	-	20,2	0,5
	2 <sup>a</sup>	20,3	19,4	20,6	20,3	20,3		
	Média	20,4	19,4	20,6	20,4	20,3		
14	1 <sup>o</sup> Análise	21,8	20,3	-	21,5	21,5	21,4	0,7
	2 <sup>a</sup>	22,0	20,1	22,0	21,4	21,4		
	Média	21,9	20,2	22,0	21,4	21,4		
2,8	1 <sup>o</sup> Análise	24,4	23,5	25,0	24,2	-	24,4	0,5
	2 <sup>a</sup>	24,7	23,9	25,2	24,4	24,4		
	Média	24,5	23,7	25,1	24,3	24,4		
1,4	1 <sup>o</sup> Análise	25,7	-	26,5	26,5	26,5	26,2	0,6
	2 <sup>a</sup>	25,9	25,3	26,5	26,8	26,8		
	Média	25,8	25,3	26,5	26,6	26,6		
0,28	1 <sup>o</sup> Análise	28,6	28,2	29,3	30,6	-	29,2	0,8
	2 <sup>a</sup>	28,5	28,3	29,3	29,7	29,7		
	Média	28,5	28,2	29,3	30,1	29,7		
0,14	1 <sup>o</sup> Análise	30,2	29,3	-	-	-	30,6	0,9
	2 <sup>a</sup>	30,3	29,3	30,7	31,4	31,4		
	Média	30,2	29,3	30,7	31,4	31,4		
0,028	1 <sup>o</sup> Análise	32,6	32,9	-	34,9	34,9	33,7	1,0
	2 <sup>a</sup>	-	32,5	33,7	33,9	-		
	Média	32,6	32,7	33,7	34,4	34,9		
0,0028	1 <sup>o</sup> Análise	37,3	-	38,0	39,7	39,7	38,5	1,2
	2 <sup>a</sup>	37,4	37,4	-	39,9	39,9		
	Média	37,3	37,4	38,0	39,8	39,8		

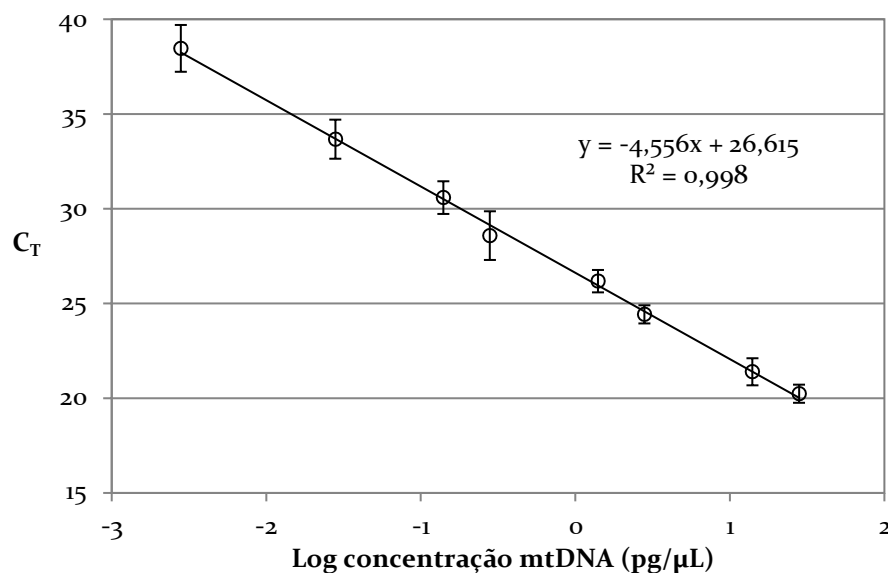
\* Em alguns casos, não foi possível a realização do ensaio em duplicado, devido a falha na obtenção de valores na concretização das quantificações. Porém, verifica-se a necessidade de ressaltar que a privação destes valores em nada influenciou os resultados adquiridos.



**Figura B1** - Gráfico relativo às diluições padrão, com os respectivos valores de  $C_T$  e médias correspondentes. Barra de erro representada para as médias de  $C_T$ .



**Figura B2** - Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  mas em função do logaritmo da concentração de mtDNA. A representação gráfica é relativa às 8 diluições padrão, realizadas em 5 ensaios e respetivo valor do coeficiente de correlação.



- Sensibilidade

**Tabela B2** - Tabela com a conversão dos valores da concentração de DNA<sub>Total</sub> e mtDNA, assim como o respetivo número de Cópias de mtDNA correspondente. Informação extra relativa aos valores, mas em função logarítmica.

Conc. DNA <sub>Total</sub> (ng/μL)	Conc. mtDNA (pg/μL)	Nº de cópias de mtDNA	Log Conc. de DNA <sub>Total</sub>	Log Conc. de mtDNA	Log Nº de cópias de mtDNA
30	82,7922	4870129,87	1,48	1,92	6,69
20	55,1948	3246753,25	1,30	1,74	6,51
15	41,3961	2435064,94	1,18	1,62	6,39
10	27,5974	1623376,62	1,00	1,44	6,21
5	13,7987	811688,31	0,70	1,14	5,91
1	2,7597	162337,66	0,00	0,44	5,21
0,5	1,3799	81168,83	-0,30	0,14	4,91
0,1	0,2760	16233,77	-1,00	-0,56	4,21
0,05	0,1380	8116,88	-1,30	-0,86	3,91
0,01	0,0276	1623,38	-2,00	-1,56	3,21
0,005	0,0138	811,69	-2,30	-1,86	2,91
0,0025	0,0069	405,84	-2,60	-2,16	2,61
0,00125	0,0034	202,92	-2,90	-2,46	2,31
0,000625	0,0017	101,46	-3,20	-2,76	2,01

\*Cálculos efetuados de acordo com a fórmula fornecida por *Butler* e descrita no Capítulo II - Material e Métodos.

**Tabela B<sub>3</sub>** - Tabela com os valores da quantificação para mtDNA, obtidos através da rt-PCR, nas 14 concentrações testadas, assim como os respectivos valores de C<sub>T</sub>.

Concentração de DNA (ng/μL)	Quantificação por RT-PCR de mtDNA (pg/μL)	C <sub>T</sub>
30	46,66490	19,49
20	91,93660	19,32
15	57,76810	20,21
10	35,94520	21,61
5	17,54010	22,97
1	3,67580	25,92
0,5	0,39390	30,15
0,1	0,21430	31,30
0,05	0,19770	31,10
0,01	0,04540	33,92
0,005	0,01760	33,81
0,0025	0,00930	34,98
0,00125	0,28260	41,91
0,000625	-	-

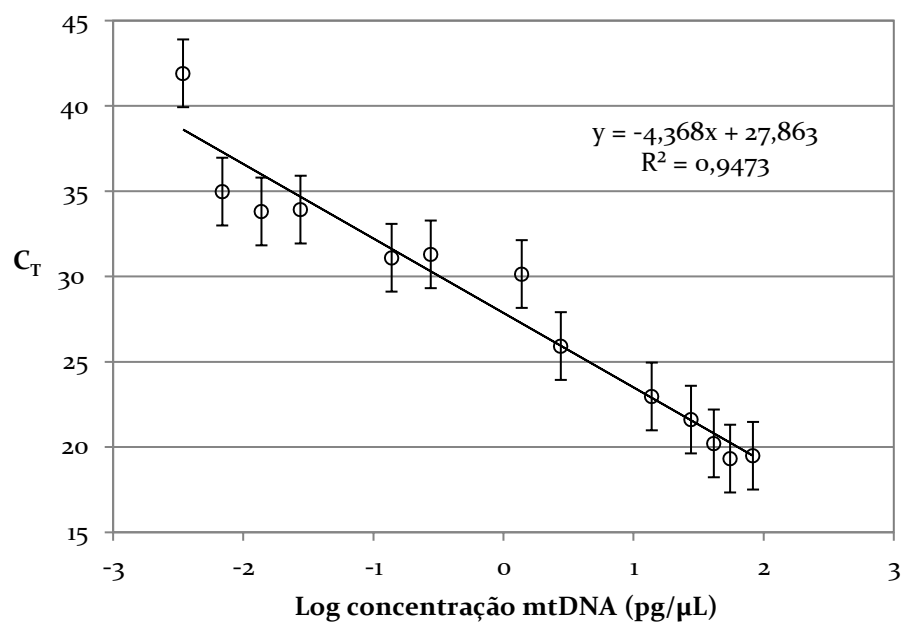
\*Não foram obtidos resultados para a menor concentração testada (de 0,000625 ng/μL).

**Tabela B<sub>4</sub>** - Tabela com informação relativa ao valor esperado e obtido para a concentração de mtDNA nas diluições testadas. São também apresentados o respetivo desvio padrão e coeficiente de variação, para cada amostra.

Quantificação de mtDNA (pg/μL) por RT-PCR				
Esperado	Obtido	Media	Desvio Padrão	Coeficiente Variação
82,7922	46,66	64,7286	18,0636	28%
55,1948	91,94	73,5657	18,3709	25%
41,3961	57,77	49,5821	8,186	17%
27,5974	35,95	31,7713	4,1739	13%
13,7987	17,54	15,6694	1,8707	12%
2,7597	3,68	3,2178	0,4580	14%
1,3799	0,39	0,8869	0,493	56%
0,2760	0,21	0,2452	0,0308	13%
0,1380	0,20	0,1679	0,0298	18%
0,0276	0,05	0,0365	0,0089	24%
0,0138	0,02	0,0157	0,0019	12%
0,0069	0,01	0,0081	0,0012	15%
0,0034	0,28	0,1430	0,1396	98%
Média CV				26%

\*Não foram obtidos resultados para a menor concentração testada (de 0,000625 ng/μL) e, como tal, a mesma não foi tida em conta para os cálculos sobre os valores da tabela acima representada.

**Figura B3** - Correlação entre a média dos valores de  $C_T$  em função da concentração de mtDNA. Representações gráficas relativas às 14 diluições realizadas, com o erro padrão associado e o valor do coeficiente de correlação.



**Anexo 3.1.2** - Quantificação de ncDNA através kit “Quantifiler® Trio DNA Quantification” por PCR em Tempo-Real.

**-Precisão**

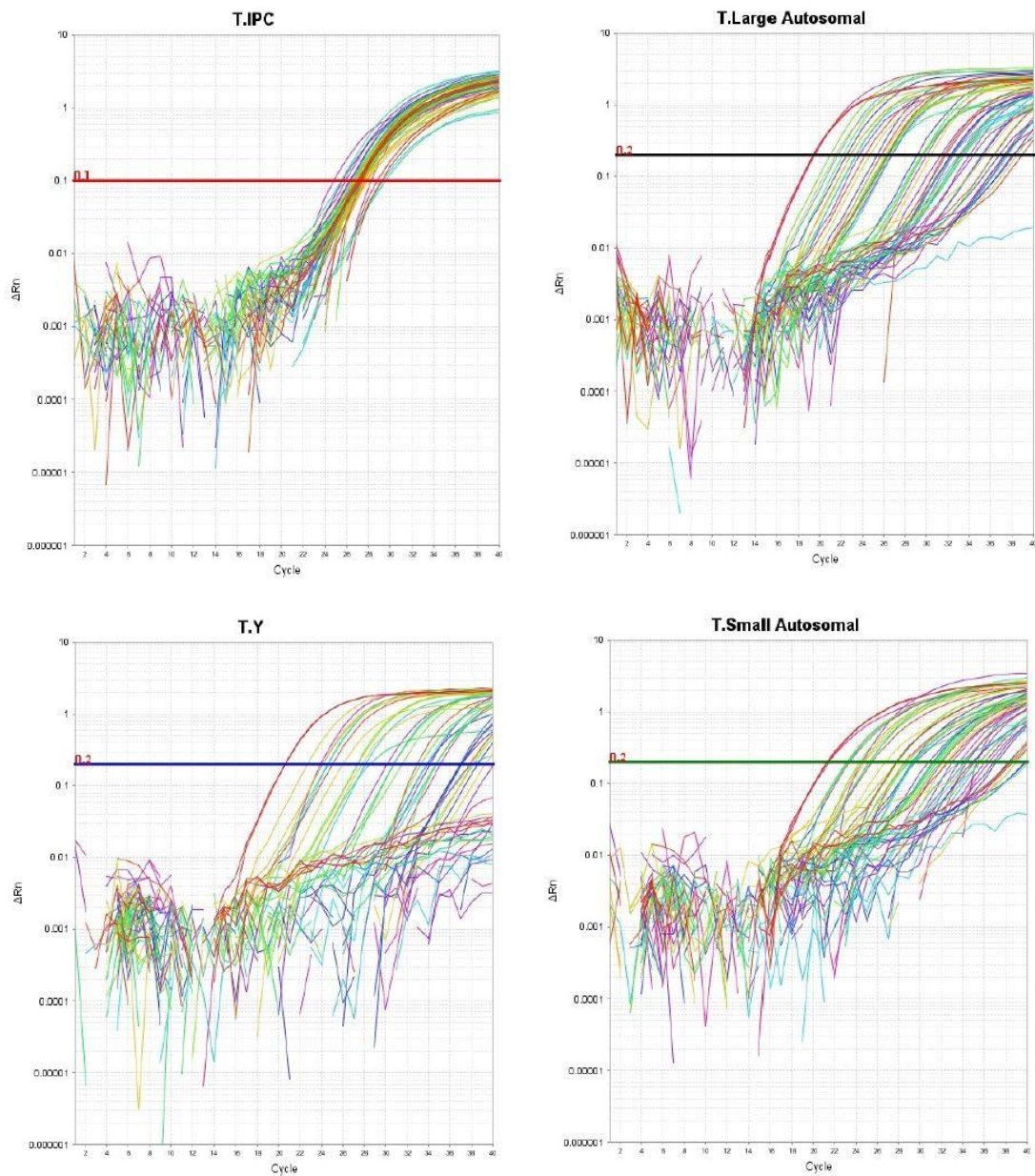
**Tabela B5** - Tabela complementar dos valores de C<sub>T</sub>, em função da concentração de ncDNA padrão, em duplicado, obtidos nos respectivos 3 ensaios e para os diferentes alvos.

Concentração (ng/μL)	Valor de C <sub>T</sub>						
	ncDNA alvo	Ensaio 1	Media 1	Ensaio 2	Média 2	Ensaio 3	Média 3
50	1 <i>Large</i>	19,4253	19,3986	19,4687	19,4632	19,4215	19,3909
	2 <i>Large</i>	19,3720		19,4576		19,3603	
50	1 <i>Small</i>	21,3705	21,3311	20,7769	20,7552	21,2025	21,1729
	2 <i>Small</i>	21,2917		20,7334		21,1432	
5	1 <i>Large</i>	22,8628	22,8755	22,9297	22,9174	22,6827	22,5941
	2 <i>Large</i>	22,8883		22,9051		22,5054	
5	1 <i>Small</i>	24,6365	24,7171	24,1516	24,1166	24,5078	24,4614
	2 <i>Small</i>	24,7976		24,0817		24,4150	
0,5	1 <i>Large</i>	26,1782	26,2450	26,4387	26,3783	25,7848	25,7527
	2 <i>Large</i>	26,3117		26,3180		25,7205	
0,5	1 <i>Small</i>	27,9803	27,9202	27,5891	27,4136	27,6566	27,5194
	2 <i>Small</i>	27,8602		27,2382		27,3822	
0,05	1 <i>Large</i>	29,7447	29,6805	30,1768	30,1768	29,1242	28,9896
	2 <i>Large</i>	29,6163		-		28,8550	
0,05	1 <i>Small</i>	31,1809	31,3190	30,8775	30,8775	30,5703	30,7701
	2 <i>Small</i>	31,4572		-		30,9698	
0,005	1 <i>Large</i>	33,5091	33,3684	-	-	31,9489	32,0234
	2 <i>Large</i>	33,2278		-		32,0978	
0,005	1 <i>Small</i>	34,1731	34,2881	-	-	33,4784	33,4033
	2 <i>Small</i>	34,4031		-		33,3282	

\* Em alguns casos, não foi possível a realização do ensaio em duplicado, devido a defeito na obtenção de valores na concretização das quantificações. Porém, verifica-se a necessidade de ressaltar que a privação destes valores em nada influenciou os resultados adquiridos.

## - Sensibilidade

**Figura B4** – Imagem com os 4 gráficos, de acordo com o parâmetro em análise, representativos da amplificação e posterior quantificação de ncDNA por rt-PCR, relativo às diferentes concentrações testadas do controlo *DNA K562* (30 a 0,000625 ng/μL de DNA).

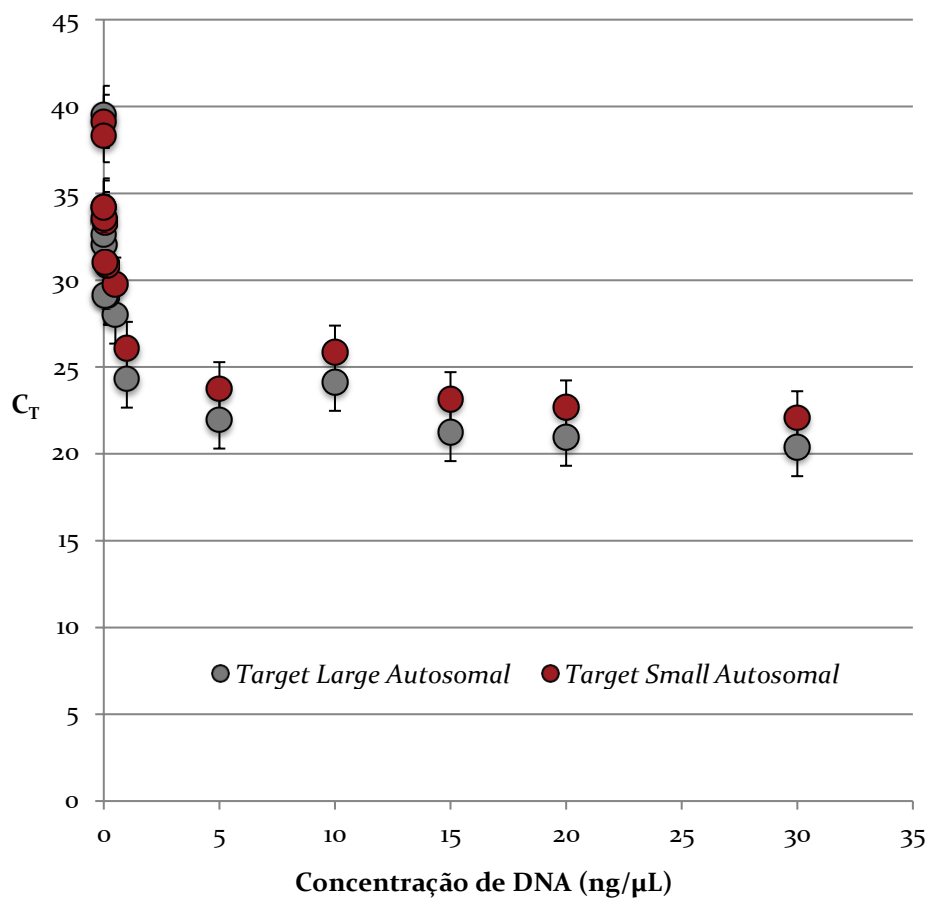


**Tabela B6** – Tabela completa, relativa ao valor obtido para a concentração de ncDNA nas diluições testadas e o respectivo C<sub>T</sub> obtido para cada quantificação. A quantificação apresenta-se discriminada, de acordo com os alvos presentes no *kit* utilizado.

Quantificação de ncDNA (ng/μL) por rt-PCR			
Concentração testada (ng/μL)	Tipologia	Concentração obtida (ng/μL)	C <sub>T</sub>
30	<i>T. IPC</i>	-	26,7059
	<i>T. Large Autossomal</i>	26,8292	20,3655
	<i>T. Small Autossomal</i>	20,168	22,0709
20	<i>T. IPC</i>	-	26,7519
	<i>T. Large Autossomal</i>	18,1662	20,9644
	<i>T. Small Autossomal</i>	13,1502	22,6945
15	<i>T. IPC</i>	-	27,3966
	<i>T. Large Autossomal</i>	15,2196	21,2362
	<i>T. Small Autossomal</i>	9,5234	23,1651
10	<i>T. IPC</i>	-	26,0684
	<i>T. Large Autossomal</i>	2,3153	24,1284
	<i>T. Small Autossomal</i>	1,5085	25,8522
5	<i>T. IPC</i>	-	24,3677
	<i>T. Large Autossomal</i>	9,505	21,9593
	<i>T. Small Autossomal</i>	6,4008	23,7445
1	<i>T. IPC</i>	-	26,2628
	<i>T. Large Autossomal</i>	2,0567	24,3103
	<i>T. Small Autossomal</i>	1,303	26,0657
0,5	<i>T. IPC</i>	-	26,0076
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,186	28,0011
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,1031	29,7656
0,1	<i>T. IPC</i>	-	26,4526
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,0925	29,0737
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0484	30,8682
0,05	<i>T. IPC</i>	-	26,256
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,0904	29,1094
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0443	30,9957
0,01	<i>T. IPC</i>	-	25,4914
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,0133	32,0485
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0088	33,3529
0,005	<i>T. IPC</i>	-	25,8558
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,0092	32,6149
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0077	33,5422
0,0025	<i>T. IPC</i>	-	26,094
	<i>T. Large Autossomal</i>	0,0033	34,2043
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0034	34,2043
0,00125	<i>T. IPC</i>	-	27,9584
	<i>T. Large Autossomal</i>	0	39,5344
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0001	39,1453
0,000625	<i>T. IPC</i>	-	26,9903
	<i>T. Large Autossomal</i>	-	-
	<i>T. Small Autossomal</i>	0,0001	38,3238

\*Uma vez que o DNA controlo utilizado para o teste de sensibilidade – Controlo *DNA K562* – é referente a uma amostra do género feminino (como indicado pelo fabricante - *Promega*), não se tornou necessário indicar, na tabela supra apresentada, os valores da quantificação para o parâmetro “*Target Y*”, uma vez que os mesmos seriam nulos.

**Figura B5** - Correlação entre os valores de  $C_T$  em função da concentração de DNA. Representações gráficas relativas às 14 diluições realizadas, com o erro padrão associado e o valor do coeficiente de correlação.





## Anexo 3.2 - Impacto da Quantificação no DNA humano

### – Recurso às Amostras Biológicas.

#### Anexo 3.2.1 - Quantificação de ncDNA, em amostras biológicas

**Tabela B7** - Tabela completa, relativa ao valor obtido para a concentração de ncDNA nas amostras estudadas e o respetivo  $C_T$  obtido para cada quantificação. A quantificação apresenta-se discriminada, de acordo com os alvos presentes no *kit* utilizado.

Quantificação do ncDNA (ng/ $\mu$ L) por RT-PCR

Amostra	Tipologia	Concentração detetada (ng/ $\mu$ L)	Índice de Degradação ( <i>small/large</i> )	$C_T$
<i>Sangue</i>				
SG1	<i>T. IPC</i>	-	0,5611	27,1186
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,9653		25,3209
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,5416		27,8021
	<i>T. Y</i>	-		-
SG2	<i>T. IPC</i>	-	4,4333	25,8794
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,003		34,0196
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0133		33,0348
	<i>T. Y</i>	-		-
SG3	<i>T. IPC</i>	-	0,5852	26,8424
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0528		29,7061
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0309		31,8449
	<i>T. Y</i>	-		-
SG4	<i>T. IPC</i>	-	0,5958	27,1202
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0433		30,0037
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0258		32,1018
	<i>T. Y</i>	-		-
SG5	<i>T. IPC</i>	-	1,5	26,5168
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0014		35,2053
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0021		35,6122
	<i>T. Y</i>	-		-
SG6	<i>T. IPC</i>	-	0,2857	27,1897
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0007		36,288
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0002		39,0382
	<i>T. Y</i>	0,0004		38,1656
SG7	<i>T. IPC</i>	-	1	26,7857
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0003		37,4587
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0003		38,2752
	<i>T. Y</i>	-		-

SG8	T. IPC	-	0,4286	27,0216
	T. Large Autossomal	0,0007		36,3293
	T. Small Autossomal	0,0003		38,5143
	T. Y	0,0004		37,825
SG9	T. IPC	-	1,3692	27,1815
	T. Large Autossomal	0,013		31,8204
	T. Small Autossomal	0,0178		32,6274
	T. Y	-		-
SG10	T. IPC	-	2,6364	26,4586
	T. Large Autossomal	0,0011		35,8872
	T. Small Autossomal	0,0029		34,9525
	T. Y	-		-
SG11	T. IPC	-	0,75	27,055
	T. Large Autossomal	0,0004		37,2686
	T. Small Autossomal	0,0003		38,2958
	T. Y	-		-
SG12	T. IPC	-	2,6	26,2983
	T. Large Autossomal	0,002		34,9583
	T. Small Autossomal	0,0052		34,1079
	T. Y	0,004		34,1581
SG13	T. IPC	-	0,4545	25,9684
	T. Large Autossomal	0,0011		35,8426
	T. Small Autossomal	0,0005		37,4929
	T. Y	-		-
SG14	T. IPC	-	1,0625	26,2415
	T. Large Autossomal	0,0064		33,1699
	T. Small Autossomal	0,0068		33,7385
	T. Y	0,0073		33,278
SG15	T. IPC	-	0,6923	26,2842
	T. Large Autossomal	0,0039		33,9531
	T. Small Autossomal	0,0027		35,0613
	T. Y	0,0012		35,9414
SG16	T. IPC	-	0,8219	26,2773
	T. Large Autossomal	0,0073		32,9842
	T. Small Autossomal	0,006		33,9039
	T. Y	0,0062		33,5174
SG17	T. IPC	-	1,28	26,2696
	T. Large Autossomal	0,0025		34,3157
	T. Small Autossomal	0,0032		35,0627
	T. Y	0,0054		34,1112
SG18	T. IPC	-	1,2353	27,1784
	T. Large Autossomal	0,0051		33,2181
	T. Small Autossomal	0,0063		34,0971
	T. Y	-		-
SG19	T. IPC	-	0,4884	25,4697
	T. Large Autossomal	0,0043		33,5023
	T. Small Autossomal	0,0021		35,635
	T. Y	0,0036		34,7176
SG20	T. IPC	-	0,3684	27,339
	T. Large Autossomal	0,0095		32,291
	T. Small Autossomal	0,0035		34,9105
	T. Y	0,0062		33,9039

<b>SG21</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,3542	27,4154
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0144		31,6639
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0051		34,3788
	<i>T. Y</i>	0,0121		32,9231
<b>SG22</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,4111	27,5834
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,71		25,7843
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,2919		28,675
	<i>T. Y</i>	0,3942		27,7486
<b>SG23</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,4928	27,4061
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,5225		26,2471
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,2575		28,852
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>SG24</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,3829	27,3653
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,4628		26,43
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,1772		29,3796
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>SG25</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,4319	27,0446
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,3737		26,7527
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,1614		29,5118
	<i>T. Y</i>	0,3099		28,1054
<b>SG26</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,3794	27,2851
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,3885		26,6941
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,1474		29,6398
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>SG27</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,4143	27,6231
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,7338		25,7347
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,304		28,6177
	<i>T. Y</i>	-		-

#### Zaragatoas Bucais

<b>ZG1</b>	<i>T. IPC</i>	-	1,0723	26,9911
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,498		26,3196
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,534		27,8221
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>ZG2</b>	<i>T. IPC</i>	-	1,4538	26,9437
	<i>T. Large Autosomal</i>	1,9815		24,2358
	<i>T. Small Autosomal</i>	2,8808		25,442
	<i>T. Y</i>	2,5905		24,9547
<b>ZG3</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,7569	27,6134
	<i>T. Large Autosomal</i>	1,5024		24,6534
	<i>T. Small Autosomal</i>	1,1371		26,7548
	<i>T. Y</i>	1,3084		25,9683
<b>ZG4</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,4195	29,5931
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,503		26,3045
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,211		29,1334
	<i>T. Y</i>	0,2326		28,5314
<b>ZG5</b>	<i>T. IPC</i>	-	1,082	27,4379
	<i>T. Large Autosomal</i>	44,7575		19,5318
	<i>T. Small Autosomal</i>	48,4259		21,457
	<i>T. Y</i>	-		-

<b>ZG6</b>	<i>T. IPC</i>	-	1,9346	24,7998
	<i>T. Large Autosomal</i>	2,7664		23,7322
	<i>T. Small Autosomal</i>	5,3519		24,5674
	<i>T. Y</i>	5,3109		23,8894
<b>ZG7</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,9643	29,3656
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0084		32,4729
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0081		33,7427
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>ZG8</b>	<i>T. IPC</i>	-	6,4091	26,6371
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0044		33,4517
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0282		31,9752
	<i>T. Y</i>	0,0307		31,5362
<b>ZG9</b>	<i>T. IPC</i>	-	6,1	26,602
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,006		32,9953
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0366		31,606
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>ZG10</b>	<i>T. IPC</i>	-	3,5587	27,2364
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0179		31,3363
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0637		30,8252
	<i>T. Y</i>	0,0796		30,1225

#### Cabelo

<b>CB1</b>	<i>T. IPC</i>	-	2,25	25,515
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0008		36,3535
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0018		35,6515
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB2</b>	<i>T. IPC</i>	-	2	26,0959
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0003		37,731
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0006		37,3402
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB3</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,5	26,6728
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0004		37,4652
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0002		39,2261
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB4</b>	<i>T. IPC</i>	-	25	26,5954
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0001		39,218
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0025		35,1999
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB5</b>	<i>T. IPC</i>	-	3	26,4357
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0001		39,1078
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0003		38,0781
	<i>T. Y</i>	0,0003		38,1192
<b>CB6</b>	<i>T. IPC</i>	-	1,9231	26,0152
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0013		35,6776
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0025		35,192
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB7</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,5714	26,6155
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0007		36,5792
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0004		37,921
	<i>T. Y</i>	-		-

CB8	<i>T. IPC</i>	-	0,7778	26,0859
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0018		35,1382
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0014		35,999
	<i>T. Y</i>	0,0004		37,6012
CB9	<i>T. IPC</i>	-	3	26,8032
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0001		39,1213
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0003		38,3637
	<i>T. Y</i>	-		-
CB10	<i>T. IPC</i>	-	65	26,3183
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0002		38,3544
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,013		32,7846
	<i>T. Y</i>	0,0003		37,936
CB11	<i>T. IPC</i>	-	14,35	26,8815
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,002		34,9341
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0287		31,628
	<i>T. Y</i>	-		-
CB12	<i>T. IPC</i>	-	2,1867	26,1511
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,015		31,8719
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0328		31,435
	<i>T. Y</i>	-		-
CB13	<i>T. IPC</i>	-	-	25,9254
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0003		38,395
	<i>T. Y</i>	-		-
CB14	<i>T. IPC</i>	-	4	26,4902
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0001		39,2054
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0004		37,7792
	<i>T. Y</i>	-		-
CB15	<i>T. IPC</i>	-	8,2174	26,2443
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0023		34,7807
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0189		32,2364
	<i>T. Y</i>	-		-
CB16	<i>T. IPC</i>	-	5,4286	26,4155
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0007		36,5827
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0038		34,5887
	<i>T. Y</i>	-		-
CB17	<i>T. IPC</i>	-	-	26,565
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0003		38,0671
	<i>T. Y</i>	-		-
CB18	<i>T. IPC</i>	-	-	25,5285
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0054		34,0783
	<i>T. Y</i>	-		-
CB19	<i>T. IPC</i>	-	-	26,0965
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0005		37,6866
	<i>T. Y</i>	-		-
CB20	<i>T. IPC</i>	-	-	25,3269
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0013		36,1776
	<i>T. Y</i>	-		-

<b>CB21</b>	<i>T. IPC</i>	-	-	26,2607
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0001		39,4735
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB22</b>	<i>T. IPC</i>	-	0,8512	26,1881
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,041		30,3234
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0349		31,3447
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB23</b>	<i>T. IPC</i>	-	1.7338	26,0959
	<i>T. Large Autosomal</i>	0,0003		37,7309
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0006		37,3401
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB24</b>	<i>T. IPC</i>	-	-	25,9444
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0004		38,005
	<i>T. Y</i>	-		-
<b>CB25</b>	<i>T. IPC</i>	-	-	26,0707
	<i>T. Large Autosomal</i>	-		-
	<i>T. Small Autosomal</i>	0,0027		35,0729
	<i>T. Y</i>	-		-



Contents lists available at ScienceDirect

## Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/FSIGSS](http://www.elsevier.com/locate/FSIGSS)



# DNA quantification by real-time PCR in different forensic samples

C. Martins<sup>a</sup>, G. Lima<sup>b,\*</sup>, MR. Carvalho<sup>b</sup>, L. Cainé<sup>a</sup>, MJ. Porto<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Legal Medicine and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

<sup>b</sup> National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, North Department, Oporto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 August 2015

Accepted 23 September 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Forensic science

DNA quantification

Real-time PCR

### ABSTRACT

The quantification of human DNA is an important procedure since it ensures the competence of the assays carried out in forensic samples. The estimation of the DNA quantity enables the prevention of dissipation of DNA samples used in assays. Its realization by real-time PCR is an attractive assay for quantification of unknown samples.

In this study, quantification of human DNA (nuclear and mitochondrial) from three different biological samples (blood, buccal swabs and hair) and different concentrations from control DNA K562 (Promega) was performed using TaqMan<sup>1</sup> Universal PCR Master Mix assay and Quantifiler<sup>1</sup> Trio DNA Quantification Kit. Based on quantification data, different PCR protocols were tested in order to provide information about the more adequate assay to use.

DNA quantification (both nuclear and mitochondrial) is an essential tool since it allows the forensic expert to decide what kind of DNA analysis is going to perform, without loss of sample.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Forensic analysis of human DNA (nuclear and mitochondrial) in forensic samples can be a challenging task. Factors like degradation and/or small amounts of DNA can impossibility the analysis due to the lack of quality material to use in the assays [1,2]. The quantification after DNA extraction it is an important step, which provides the information about the amount of DNA present in unknown samples. This data can be used successfully to obtain better quality results preserving the sample for further analysis [3,4].

In this study, the quantification by real-time PCR of human DNA was used to provide information about the amount of material present in different forensic samples (blood, buccal swabs and hair). The quantification data was used to test different protocols in order to get the best outcomes ensuring the competence of the assays carried out in forensic samples.

Quantification of nuclear DNA (ncDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) was performed in 68 samples (blood samples, buccal swabs and hairs). Additionally, 12 different concentrations of control DNA K562 (Promega), in a range of 30 ng/mL–0.0025 ng/mL, were also quantified. The quantification assays for ncDNA and

mtDNA were done separately in all samples, using two different real-time PCR methods. Based on quantification data, a set of samples was chosen to perform STR (short tandem repeats) analysis using three different protocols.

The mtDNA analysis was done by direct sequencing of the hypervariable segments (HV1 and HV2) only in the 12 different concentrations of control DNA K562 (Promega).

## 2. Material and methods

The DNA extraction from blood and buccal swabs samples was done by Chelex<sup>1</sup>100 [5]. These samples were collected and extracted from 2002 to 2010 and then stored in the freezer. The DNA extraction from hair samples was performed using the Tissue & Hair Extraction Kit and DNA IQ<sup>TM</sup> System (Promega), following the manufacturer guidelines.

The quantification of nuclear DNA (ncDNA) was done using Quantifiler<sup>1</sup>Trio DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer guidelines. The quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) was performed using a TaqMan<sup>1</sup> Master Mix assay (Applied Biosystems) described by Niederstätter et al. [2] using only the detection of the 283 base pair (bp) fragment. Both assays were performed in the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem).

The STR (short tandem repeats) analysis was done using three different kits: GlobalFiler (Applied Biosystem), MiniFiler (Applied Biosystem) and PowerPlexFusion (Promega), using the manufacturer guidelines.

\* Corresponding author at: Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do INMLCF, IP, Jardim Carrilho Videira, 4050-167 Porto, Portugal.  
Fax: +351 222 025 354.

E-mail address: [glima@dpinml.mj.pt](mailto:glima@dpinml.mj.pt) (G. Lima).

The mtDNA analysis was performed by direct sequencing of hypervariable segments 1 and 2 (HV1 and HV2) using BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems). This analysis was done only in the control DNA K562.

The quantification of ncDNA and mtDNA was done in 32 blood samples, 11 buccal swabs and 25 hair samples. Both assays were also performed in 12 different concentrations of control DNA K562 (Promega) ranged between 30 ng/mL–0.0025 ng/mL.

### 3. Results and discussion

Based on quantification data, the STR analysis was made in 11 samples of blood and 5 samples of buccal swabs. The remain samples presented very low quantities (0.0002–0.0021 ng/mL) and/or the presence of some degradation levels (degradation index: 4.43–6.4). A full profile was obtained in 2 blood samples and 1 buccal swab. No degradation was detected in these samples. An incomplete profile was observed in 9 blood samples and 4 buccal swabs. These samples presented a degradation index between 1.23 and 263.

STR analysis was also made using the different concentrations of control DNA K562. As expected, concentrations above 15 ng/mL presented poor profiles due to excess of DNA. Concentrations under 0.01 ng/mL gave poor or none results.

Only 4 hair samples were selected based on quantification data (ncDNA) for STR analysis. It was possible to obtain a complete profile in 1 sample (no degradation detected), being the other 3 incomplete (degradation index: 2.1867–8.2174). Fragment analysis was not performed in the remain hair samples due to the low ncDNA concentrations obtained (0.0001–0.0038 ng/mL) and/or high levels of degradation (degradation index: 14.35–65).

The analysis of mtDNA was made only in the control DNA K562. In all of the tested concentrations it was possible to obtain a complete and good quality sequences for both segments HV1 and HV2.

The mtDNA quantification data by *TaqMan* assay suggests that concentrations above 30 ng/mL of total DNA can inhibit amplification due to excess of DNA. Also, lower concentrations should be tested since 0.0025 ng/mL was not limitative for PCR. The knowledge of the appropriate quantity of sample to use in the PCR reaction is an important tool to preserve forensic samples for further analysis.

### 4. Conclusions

DNA quantification (both nuclear and mitochondrial) is an essential tool since it allows the forensic expert to decide what kind of DNA analysis is going to perform, without loss of sample.

The results showed that the Quantifiler<sup>1</sup> Trio DNA Quantification Kit is a robust and accurate method for ncDNA quantification. The degradation index also included in this kit allow us to better predict if a STR analysis approach is viable.

mtDNA quantification using TaqMan<sup>1</sup> Universal PCR Master Mix Assay revealed to be useful to predict the quantity of mtDNA but it is an expensive and more laborious methodology.

### References

- [1] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, O. García, L.F. Simón, J. García-Hirschfeld, M. Sancho, C. Rúa, J. Fernández-Piqueras, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 141–149.
- [2] H. Niederstätter, S. Köchl, P. Grubwieser, M. Pavlic, M. Steinlechner, Parson W., A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA, *Forensic Sci. Int.* 1 (2007) 29–34 Genetics.
- [3] S. Witt, J. Neumann, H. Zierdt, G. Gébel, C. Röscheisen, Establishing a novel automated magnetic bead-based method for extraction of DNA from a variety of Forensic samples, *Forensic Sci. Int.* 6 (2012) 539–547 Genetics.
- [4] J.M. Butler, *Forensic DNA Typing—Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, Elsevier Academic Press, 2005, pp. 33–412.
- [5] Metzger D.A. Walsh, R. Higuchi, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques* 10 (1991) 506–513.